

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 033894

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2019.12.06

(21) Номер заявки  
201791231

(22) Дата подачи заявки  
2015.12.15

(51) Int. Cl. C07K 7/54 (2006.01)  
A61K 38/12 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

## (54) ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ

(31) 62/094,008

(32) 2014.12.18

(33) US

(43) 2018.01.31

(86) PCT/US2015/065723

(87) WO 2016/100285 2016.06.23

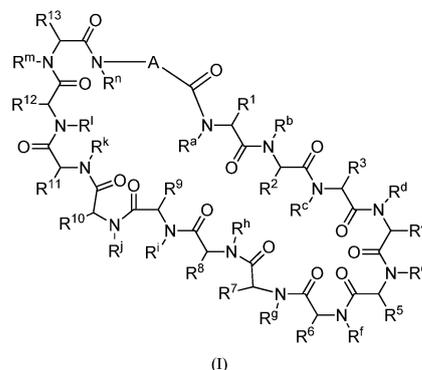
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ  
КОМПАНИ (US)

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

(74) Представитель:  
Угрюмов В.М. (RU)

(56) WO-A1-2014151634

(57) Настоящее изобретение относится к новым макроциклическим пептидам формулы (I)



или его фармацевтически приемлемым солям, которые ингибируют PD-1/PD-L1 и CD80/PD-L1 белок-белковое взаимодействие и, таким образом, являются полезными для уменьшения симптомов различных заболеваний, включая рак и инфекционные заболевания.

033894 B1

033894 B1

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данный патент испрашивает приоритет по предварительной заявке США 62/094008, поданной 18 декабря 2014 г., содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством отсылки.

Настоящее изобретение относится к новым макроциклическим пептидам, которые ингибируют PD-1/PD-L1 и CD80/PD-L1 белок-белковое взаимодействие и, таким образом, являются полезными для уменьшения симптомов различных заболеваний, включая рак и инфекционные заболевания.

Белок запрограммированной смерти клетки 1 (PD-1) является ингибирующим членом семейства рецепторов CD28, которое также включает CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al., *supra*; 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 I типа с массой 55 кДа, который является частью суперсемейства гена Ig (Agata et al., *Int. Immunol.*, 8:765-772 (1996)). PD-1 содержит мембранный проксимальный иммунорецепторный тирозин-ингибирующий мотив (ITIM) и мембранный дистальный переключающий мотив на основе тирозина (ITSM) (Thomas, M.L., *J. Exp. Med.*, 181:1953-1956 (1995); Vivier, E. et al., *Immunol Today*, 18:286-291 (1997)). Несмотря на структурное сходство с CTLA-4, PD-1 не имеет мотива MYPPY, который имеет решающее значение для связывания CD80 CD86 (B7-2). Были идентифицированы два лиганда для PD-1, PD-L1 (B7-H1) и PD-L2 (b7-DC). Показано, что активация Т-клеток, экспрессирующих PD-1, снижается 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 являются членами семейства белков B7, которые связываются с PD-1, но не связываются с другими членами семейства CD28. Лиганд PD-L1 присутствует в большом количестве в различных раковых опухолях человека (Dong et al., *Nat. Med.*, 8:787-789 (2002)). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 приводит к уменьшению числа опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов, уменьшению пролиферации, опосредованной Т-клеточным рецептором, и уклонению раковых клеток от иммунного распознавания (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 обратима путем ингибирования местного взаимодействия PD-1 с PD-L1, и этот эффект является аддитивным, когда также блокируется и взаимодействие PD-1 с PD-L2 (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 M.J. et al., *Immunity*, 27:111-122 (2007)). Было показано, что взаимодействие PD-L1/CD80 на экспрессирующих иммунных клетках является ингибирующим. Было показано, что блокада этого взаимодействия отменяет указанное 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 PD-1-экспрессирующие Т-клетки контактируют с клетками, экспрессирующими его лиганды, уменьшаются функциональные активности в ответ на антигенную стимуляцию, включая пролиферацию, секрецию цитокинов и цитотоксичность. PD-1/PD-L1 или PD-L2 взаимодействия уменьшают иммунные ответы при наличии инфекции или опухоли, или в ходе развития аутоотолерантности (Keir, M.E. et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 26:Еpub (2008)). Хроническая стимуляция антигенами, такая как происходит при опухолевом заболевании или хронических инфекциях, приводит к появлению Т-клеток, которые экспрессируют повышенные уровни PD-1 и являются дисфункциональными по отношению к активности в отношении хронического антигена (см. Kim et al., *Curr. Opin. Imm.* (2010)). Это называется "истощением Т-клеток". В-клетки также демонстрируют супрессию PD-1/PD-лиганд и "истощение".

Было показано, что блокада PD-1/PD-L1 лигирования с использованием антител к PD-L1 восстанавливает и усиливает активацию Т-клеток во многих системах. Пациенты с прогрессирующим раком показывают положительный результат от терапии моноклональным антителом к PD-L1 (Brahmer et al., *New Engl. J. Med.* (2012)). Доклинические модели опухолей и хронических инфекций на животных показали, что блокада пути PD-1/PD-L1 моноклональными антителами может усилить иммунный ответ и привести к отторжению опухоли или контролю инфекции. Противоопухолевая иммунотерапия путем блокады PD-1/PD-L1 может усилить терапевтический иммунный ответ при ряде 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)).

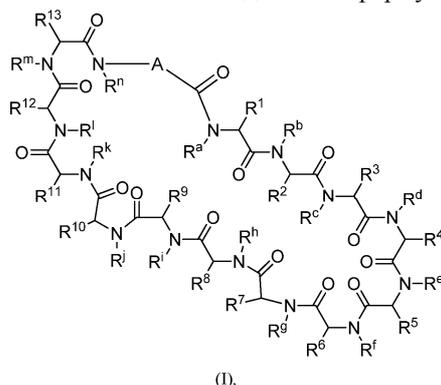
Вмешательство во взаимодействие PD-1/PD-L1 вызывает усиление активности Т-клеток в системах с хронической инфекцией. Блокада PD-L1 вызывала улучшение вирусного клиренса и восстанавливала иммунитет у мышей с вирусной инфекцией хромового лимфоцитарного хориоменингита (Barber, D.L. et al., "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection", *Nature*, 439(7077):682-687 (2006)). Гуманизированные мыши, инфицированные ВИЧ-1, демонстрируют повышенную защиту от виремии и вирусного истощения CD4<sup>+</sup> Т-клеток (Palmer et al., *J. Immunol.* (2013)). Блокада PD-1/PD-L1 через моноклональные антитела к PD-L1 может восстанавливать *in vitro* антиген-специфическую функ-

циональность к Т-клеткам у пациентов с ВИЧ (Day, Nature (2006); Petrovas, J. Exp. Med. (2006); Trautman, Nature Med. (2006); D'Souza, J. Immunol. (2007); Zhang, Blood (2001); Kaufmann, Nature Imm. (2007); Kasu, J. Immunol. (2010); Porichis, Blood (2011)), у пациентов с вирусом гепатита С (HCV) (Golden-Mason, J. Virol. (2007); Jeung, J. Leuk. Biol. (2007); Urbani, J. Hepatol. (2008); Nakamoto, PLoS Path. (2009); Nakamoto, Gastroenterology (2008)) и у пациентов с вирусом гепатита В (HBV) (Boni, J. Virol. (2007); Fisticaro, Gastro. (2010); Fisticaro 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)).

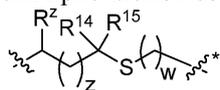
Было также показано, что блокада взаимодействия PD-L1/CD80 стимулирует иммунитет (Yang J., et al., J. Immunol. Aug 1; 187(3): 1113-9 (2011)). Было показано, что иммунная стимуляция, возникающая в результате блокады взаимодействия PD-L1/CD80, улучшается за счет комбинации с блокадой дальнейших взаимодействий PD-1/PD-L1 или PD-1/PD-L2. Предполагается, что изменения в фенотипах иммунных клеток являются важным фактором септического шока (Hotchkiss, et al., Nat Rev Immunol (2013)). К ним относятся повышенные уровни PD-1 и PD-L1 (Guignant, et al., Crit. Care (2011)). Клетки пациентов с септическим шоком с повышенными уровнями PD-1 и PD-L1 проявляют повышенный уровень апоптоза Т-клеток. Антитела, направленные на PD-L1, могут снижать уровень апоптоза иммунных клеток (Zhang et al., Crit. Care (2011)). Кроме того, мыши, не имеющие экспрессию 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 подавлять неадекватные иммунные ответы и уменьшать симптомы заболевания.

Также было показано, что наряду с усилением иммунных ответов на хронические антигены блокада пути PD-1/PD-L1 усиливает реакцию на вакцинацию, включая терапевтическую вакцинацию в случае хронической инфекции (Ha, S.J. 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<sup>+</sup> t-cell responses by soluble PD-1", J. Immunother., 34(3):297-306 (2011)).

Описанные здесь молекулы демонстрируют способность блокировать взаимодействие PD-L1 с PD-1 как в биохимических, так и в клеточных экспериментальных системах. Эти результаты согласуются с возможностью терапевтического введения для усиления иммунного ответа при раке или хронической инфекции, включая терапевтическую вакцину. Макроциклические пептиды, описанные здесь, способны ингибировать взаимодействие PD-L1 с PD-1 и с CD80. Эти соединения продемонстрировали высокоэффективное связывание с PD-L1, блокаду взаимодействия PD-L1 с PD-1 или CD80 и способны усиливать функциональную активность Т-клеток, что делает их кандидатами для композиций для парентерального, перорального, легочного, назального, буккального введения и пролонгированного высвобождения. В одном аспекте настоящее изобретение 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 имеет значение 0;

w имеет значение 1;

R<sup>14</sup> и R<sup>15</sup> представляют собой водород;

R<sup>z</sup> представляет собой -C(O)NHR<sup>16</sup>, где R<sup>16</sup> представляет собой -CHR<sup>17</sup>C(O)NH<sub>2</sub>, где R<sup>17</sup> представляет собой водород;

R<sup>1</sup> представляет собой бензил, необязательно замещенный гидроксильной группой;

R<sup>2</sup> представляет собой водород или метил;

$R^3$  представляет собой  $\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ;  
 $R^4$  представляет собой H; или  
 $R^5$  представляет собой  $\text{CH}_2$ -имидазолил;  
 $R^6$  представляет собой  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ;  
 $R^7$  представляет собой H или этил;  
 $R^8$  представляет собой  $-(\text{CH}_2)$ индолил;  
 $R^9$  представляет собой  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ;  
 $R^{10}$  выбран из  $-(\text{CH}_2)$ индолила и  $-(\text{CH}_2)$ бензотиенила, каждый необязательно замещен  $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ;  
 $R^{11}$  представляет собой бутил;  
 $R^{12}$  представляет собой бутил;  
 $R^{13}$  представляет собой изобутил;  
 $R^c, R^f, R^h, R^i$  и  $R^m$  представляют собой водород;  
 $R^n$  представляет собой водород или метил;  
 $R^a$  представляет собой водород или метил;  
 $R^j$  представляет собой водород;  
 $R^2, R^4, R^7, R^{11}, R^{12}$  могут, каждый независимо, образовывать кольцо с соответствующей вицинальной R группой, как описано ниже;

$R^b$  выбран из  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкокси- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила,  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, карбокси- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, гало- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, гидрокси- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила,  $(\text{NR}^a\text{R}^b)\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, где  $R^a$  и  $R^b$  независимо выбраны из водорода и  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила; и фенил- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, где указанный фенил необязательно замещен одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкокси,  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, циано, галогена и нитро; или  $R^b$  и  $R^2$  совместно с атомами, к которым они присоединены, образуют кольцо, выбранное из азетидина, пирролидина, морфолина, пиперидина, пиперазина и тетрагидротиазола; где каждое кольцо необязательно замещено от одной до четырех группами, независимо выбранными из amino, циано, метила, галогена и гидрокси;

$R^d$  выбран из водорода,  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкокси- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила,  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, карбокси- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, гало- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, гидрокси- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила,  $(\text{NR}^a\text{R}^b)\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, где  $R^a$  и  $R^b$  независимо выбраны из водорода и  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила; и фенил- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, где указанный фенил необязательно замещен одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкокси,  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, циано, галогена и нитро; или  $R^d$  и  $R^4$  совместно с атомами, к которым они присоединены, могут образовывать пирролидиновое кольцо;

$R^e$  представляет собой водород;

$R^g$  выбран из водорода,  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкокси- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила,  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, карбокси- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, гало- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, гидрокси- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила,  $(\text{NR}^a\text{R}^b)\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, где  $R^a$  и  $R^b$  независимо выбраны из водорода и  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила; и фенил- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, где указанный фенил необязательно замещен одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкокси,  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, циано, галогена и нитро; или  $R^g$  и  $R^7$  совместно с атомами, к которым они присоединены, могут образовывать пирролидиновое кольцо; и где пирролидин является необязательно конденсированным с циклогексильной, фенильной или индольной группой;

$R^k$  выбран из водорода и метила, или  $R^k$  и  $R^{11}$  совместно с атомами, к которым они присоединены, могут образовывать кольцо, выбранное из азетидина, пирролидина, морфолина, пиперидина, пиперазина и тетрагидротиазола; где каждое кольцо необязательно замещено от одной до четырех группами, независимо выбранными из amino, циано, метила, галогена и гидрокси; и

$R^l$  представляет собой метил, или  $R^l$  и  $R^{12}$  совместно с атомами, к которым они присоединены, образуют кольцо, выбранное из азетидина и пирролидина, где каждое кольцо необязательно замещено от одной до четырех группами, независимо выбранными из amino, циано, метила, галогена и гидрокси;

при условии, что по меньшей мере один из  $R^b, R^d, R^g$  выбран из  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкокси- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила,  $\text{C}_2\text{-C}_6$ -алкила, карбокси- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, гало- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, гидрокси- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила,  $(\text{NR}^a\text{R}^b)\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, где  $R^a$  и  $R^b$  независимо выбраны из водорода и  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила; и фенил- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, где указанный фенил необязательно замещен одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкокси,  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкила, циано, галогена и нитро.

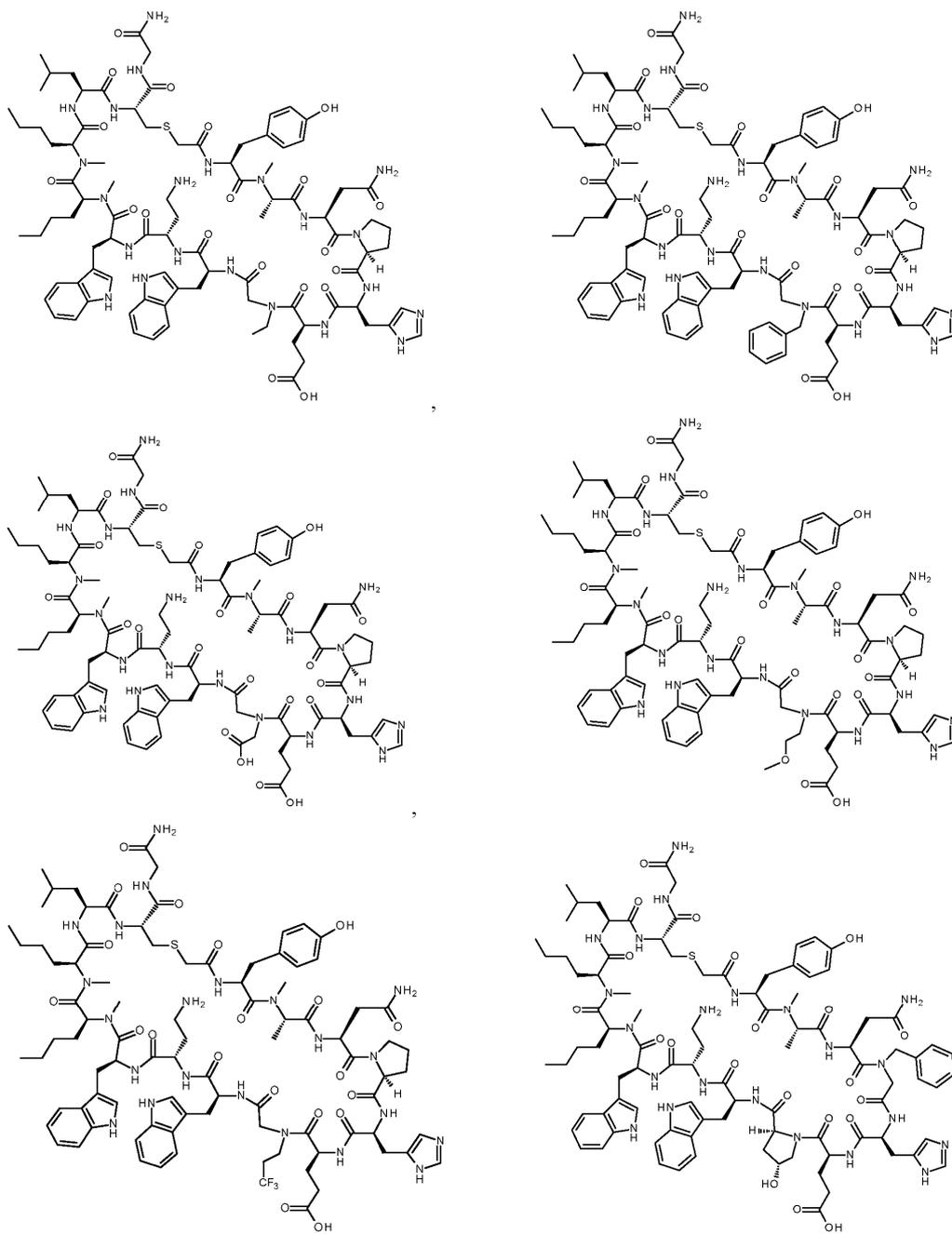
В другом варианте настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста, пролиферации или метастазирования раковых клеток у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его терапевтически приемлемой соли. В другом варианте осуществления рак выбран из меланомы, почечно-клеточной карциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), несквамозного NSCLC, колоректального рака, кастрационно-резистентного рака предстательной железы, рака яичников, рака желудка, гепатоцеллюлярной карциномы, карциномы поджелудочной железы, плоскоклеточного рака области головы и шеи, карциномы пищевода, желудочно-кишечного тракта и груди и злокачественного заболевания системы крови. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения инфекционного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его терапевтически при-

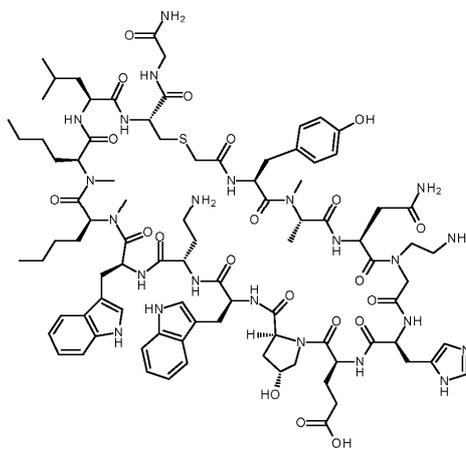
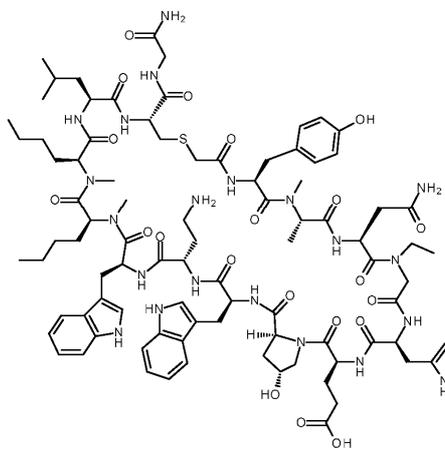
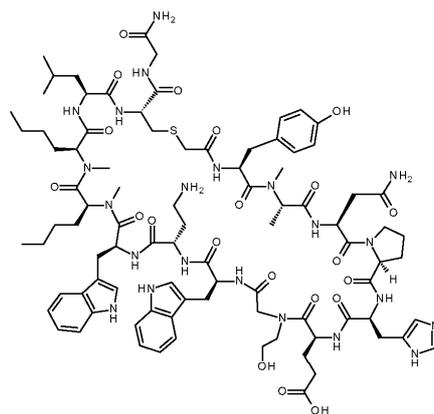
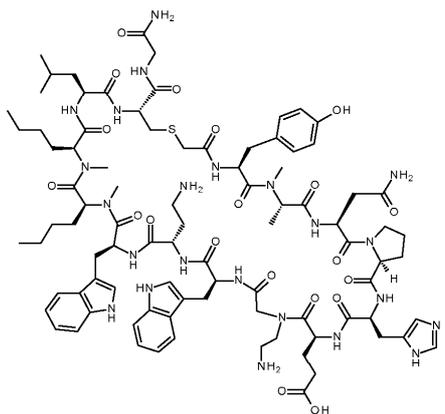
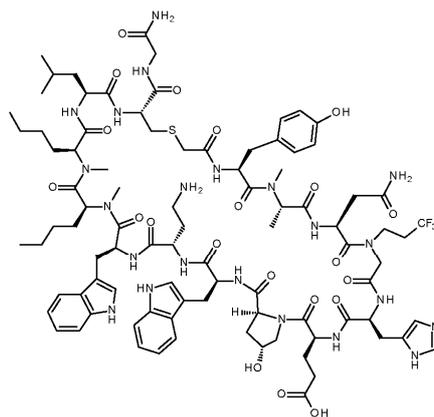
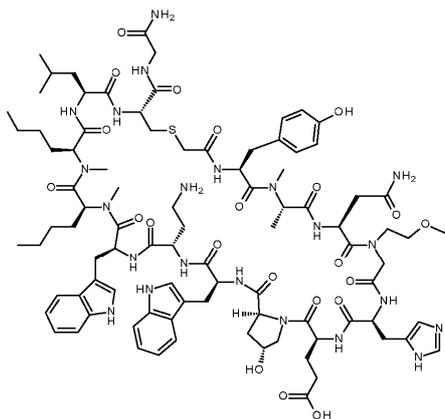
емлемой соли.

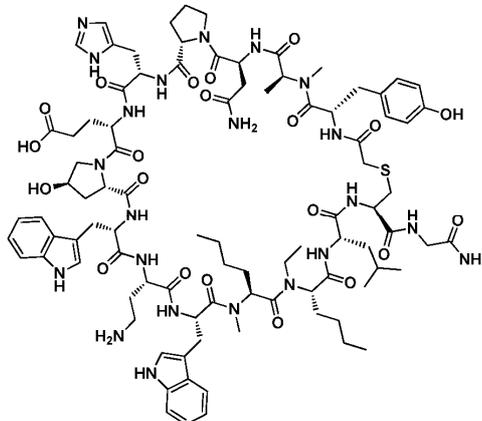
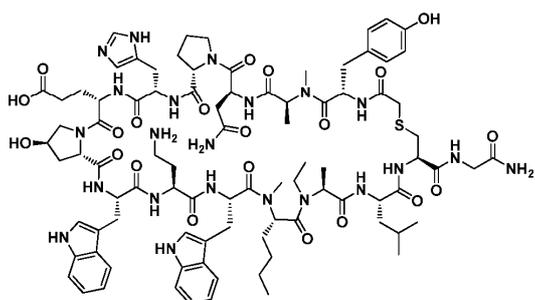
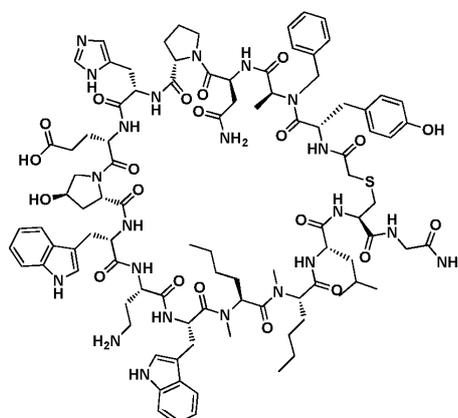
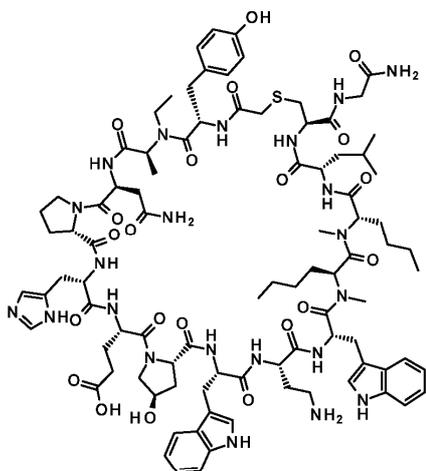
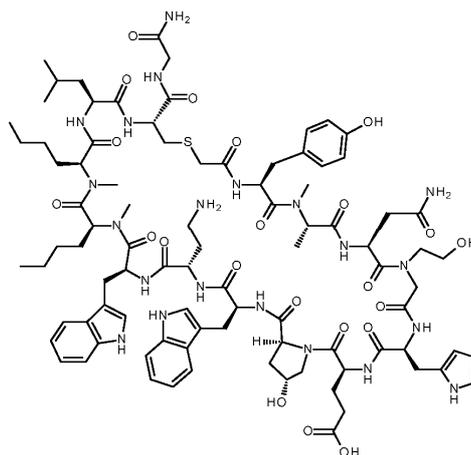
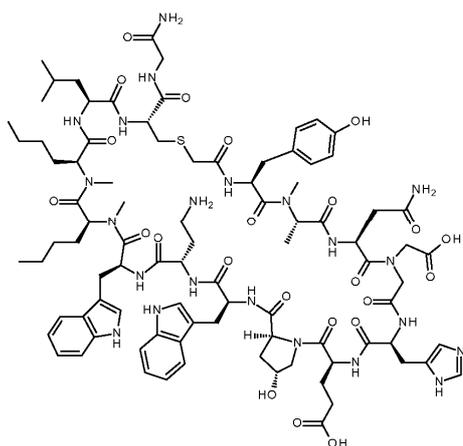
В другом варианте осуществления инфекционное заболевание вызвано вирусом. В другом варианте осуществления указанный вирус выбран из ВИЧ, вирусов гепатита А, гепатита В, гепатита С, герпеса и гриппа.

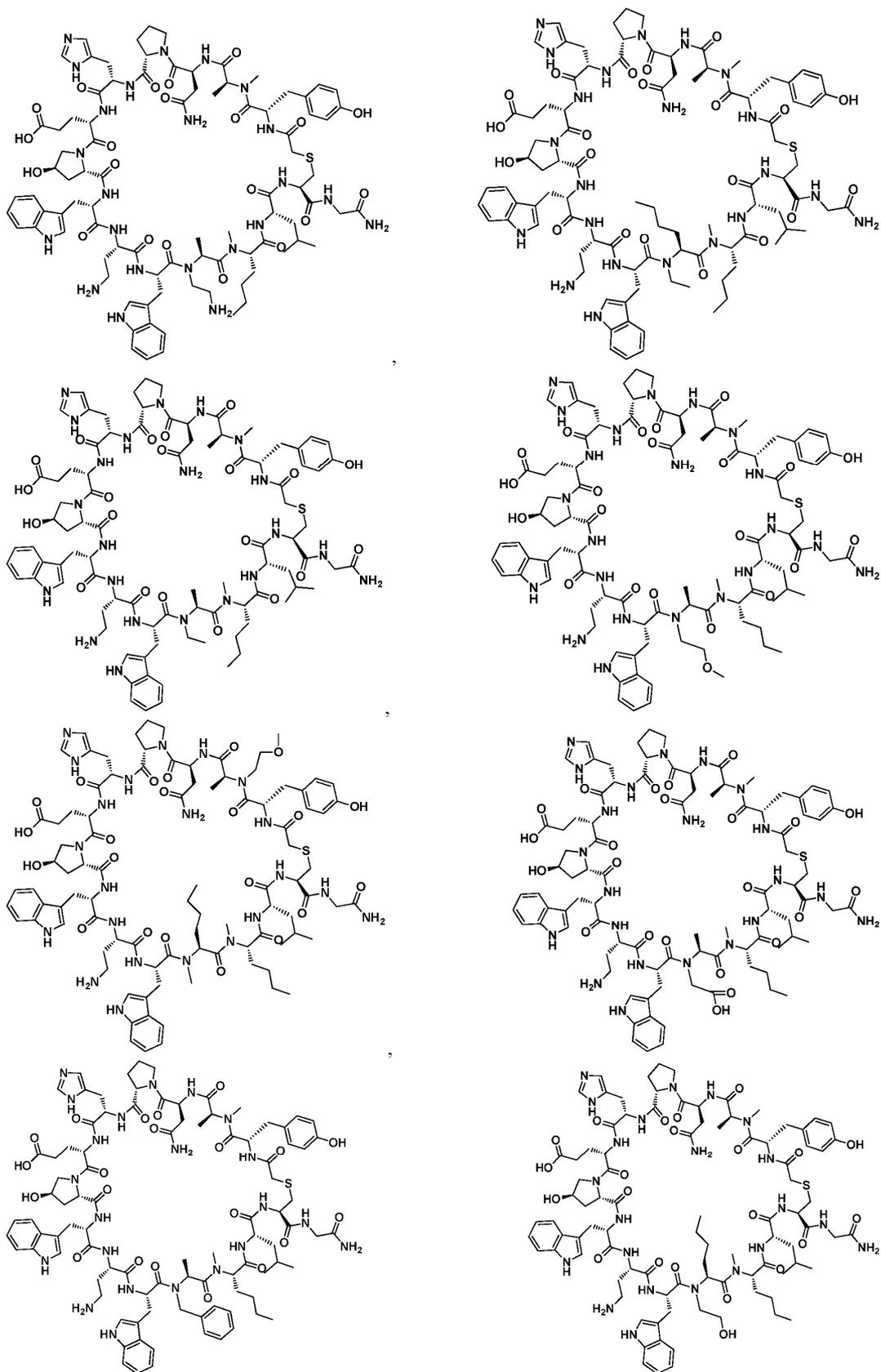
В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения септического шока у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его терапевтически приемлемой соли.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к способу блокирования взаимодействия PD-L1 с PD-1 и/или CD80 у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его терапевтически приемлемой соли. В другом варианте осуществления соединение формулы (I) выбрано из

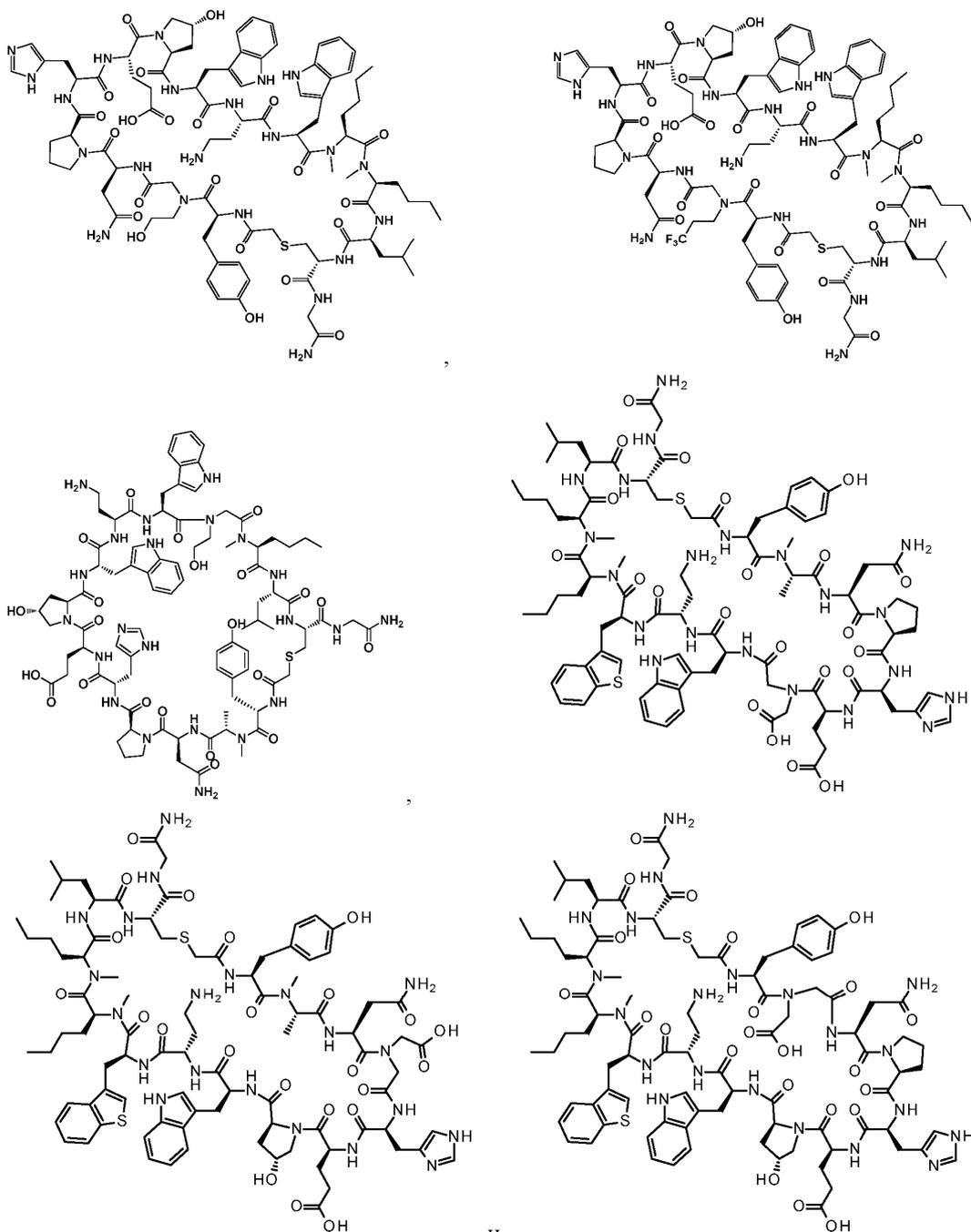












И

или его фармацевтически приемлемой соли.

В соответствии с настоящим изобретением были обнаружены пептиды, которые специфически связываются с PD-L1 и способны ингибировать взаимодействие PD-L1 с PD-1 и CD80. Эти макроциклические пептиды проявляют иммуномодулирующую эффективность *in vitro*, что делает их терапевтическими кандидатами для лечения различных заболеваний, включая рак 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 конкретной структуры (т.е. сайта связывания фермента, антигенной детерминанты или эпитопа) белка, который распознается связывающей молекулой. Например, если соединение имеет специфическое связывание для сайта связывания белка "А", присутствие соединения в реакции, содержащей белок, включающий сайт связывания А, и меченый пептид, который специфически связывается с сайтом связывания белка А, уменьшит количество меченого пептида, связанного с белком. Напротив, неспецифическое связывание соединения с белком не приводит к зависящему от концентрации вытеснению меченого пептида из белка.

Настоящее изобретение предназначено для включения всех изотопов атомов, встречающихся в предлагаемых соединениях. Изотопы включают те атомы, которые имеют один и тот же атомный номер, но разные массовые числа. В качестве общего примера и без ограничений изотопы водорода включают

дейтерий и тритий. Изотопы углерода включают  $^{13}\text{C}$  и  $^{14}\text{C}$ . Изотопно-меченные соединения по изобретению, в общем, могут быть получены обычными способами, известными специалистам в данной области, или способами, аналогичными описанным здесь, с использованием подходящего изотопно-меченного реагента вместо немеченного реагента, используемого в противном случае. Такие соединения могут иметь множество перспективных применений, например, в качестве стандартов и реагентов при определении биологической активности. В случае стабильных изотопов такие соединения могут иметь возможное применение для подходящего изменения биологических, фармакологических или фармакокинетических свойств. Дополнительным аспектом объекта изобретения, описанного здесь, является использование раскрытых пептидов в качестве радиоактивно меченых лигандов для разработки анализов связывания с лигандом или для контроля *in vivo* адсорбции, метаболизма, распределения, связывания с рецептором или занятости рецепторов, или фармакокинетики соединения. Например, описанный здесь макроциклический пептид может быть получен с использованием радиоактивного изотопа  $^{125}\text{I}$ , и полученный в результате радиоактивно меченый пептид может быть использован для разработки анализа связывания или для исследований метаболизма. В качестве альтернативы и с той же целью описанный здесь макроциклический пептид может быть преобразован в радиоактивно меченую форму путем каталитического тритирования с использованием способов, известных специалистам в данной области.

Макроциклические пептиды по настоящему изобретению также могут быть использованы в качестве агентов для РЕТ-визуализации путем добавления радиоактивной метки с использованием способов, известных специалистам в данной области техники. Предпочтительные пептиды включают по меньшей мере один из описанных здесь макроциклических пептидов, и эти пептиды могут быть включены в фармацевтические композиции и комбинации.

Приведенные здесь определения применяются, без ограничений, к терминам, которые используются в этой заявке, если в конкретных случаях не предусмотрено иное. Специалисты в области химии аминокислот и пептидов осведомлены, что аминокислота включает соединение, представленное общей структурой



где R и R' являются такими, как показано в настоящем документе.

Если не указано иное, термин "аминокислота", используемый здесь, отдельно или как часть другой группы включает, без ограничения, аминогруппу и карбоксильную группу, связанную с одним и тем же атомом углерода, называемым " $\alpha$ " углеродом, где R и/или R' может быть природной или неприродной боковой цепью, включая водород. Абсолютную конфигурацию "S" на " $\alpha$ " углероде обычно относят к "L" или "природной" конфигурации. В случае, когда оба "R" и "R'" (первичные) заместители равны водороду, аминокислота представляет собой глицин и не является хиральной.

Термины "боковая цепь природной аминокислоты" и "боковая цепь встречающейся в природе аминокислоты" в контексте данного документа 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) обычно в S-конфигурации (т.е. L-аминокислота). Термины "боковая цепь неприродной аминокислоты" и "боковая цепь не встречающейся в природе аминокислоты" в контексте данного документа относятся к боковой цепи любой встречающейся в природе аминокислоты, обычно находящейся в R-конфигурации (т.е. D-аминокислоты) или к группе, отличной от боковой цепи, встречающейся в природе аминокислоты в R- или S-конфигурации (т.е. D- или L-аминокислоты соответственно), выбранной из

C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>-алкенила, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкокси-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкоксикарбонил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкилсульфанил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, амидо-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, амино-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, азаиндолил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, бензотиазолил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, бензотиенил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, бензилокси-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, карбокси-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>-циклоалкил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, дифенилметила, фуранил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, имидазолил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, нафтил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, пиридинил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, тиазолил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, тиенил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила;

бифенил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, где указанный бифенил необязательно замещен метильной группой;

гетероциклила, необязательно замещенного одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкокси, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкилсульфониламино, амидо, амино, амино-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, аминосульфонила, карбокси, циано, галогена, гало-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, гидроксид, -NC(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, нитро и -OP(O)(OH)<sub>2</sub>;

индолил-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, где индолильная часть необязательно замещена одной группой, выбранной из C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, карбокси-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила, галогена, гидроксид и фенила, где указанный фенил также необязательно замещен одной, двумя или тремя группами, независимо выбранными из C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкокси, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкила и галогена;

$NR^yR^y(C_1-C_7\text{-алкил})$ , где  $R^y$  и  $R^y$  независимо выбраны из водорода,  $C_2-C_4$ -алкенилоксикарбонила,  $C_1-C_3$ -алкила,  $C_1-C_3$ -алкилкарбонила,  $C_3-C_{14}$ -циклоалкилкарбонила, фуранилкарбонила и фенилкарбонила. Когда алкильный линкер содержит более одного углерода, в цепи может находиться дополнительная группа  $NR^yR^y$ ;

$NR^qR^l$ -карбонил- $C_1-C_3$ -алкила, где  $R^q$  и  $R^l$  независимо выбраны из водорода,  $C_1-C_3$ -алкила и трифенилметила;

фенила, необязательно замещенного одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из  $C_1-C_4$ -алкокси,  $C_1-C_4$ -алкила,  $C_1-C_3$ -алкилсульфониламино, амидо, amino, amino- $C_1-C_3$ -алкила, аминосульфонола, карбокси, циано, галогена, гало- $C_1-C_3$ -алкила, гидроксид,  $-NC(NH_2)_2$ , нитро и  $-OP(O)(OH)_2$ ;

фенил- $C_1-C_3$ -алкила, где указанная фенильная часть необязательно замещена одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из  $C_1-C_4$ -алкокси,  $C_1-C_4$ -алкила,  $C_1-C_3$ -алкилсульфониламино, амидо, amino, amino- $C_1-C_3$ -алкила, аминосульфонола, карбокси, циано, галогена, гало- $C_1-C_3$ -алкила, гидроксид,  $-NC(NH_2)_2$ , нитро и  $-OP(O)(OH)_2$ ; и

феноксид- $C_1-C_3$ -алкила, где указанный фенил необязательно замещен  $C_1-C_3$ -алкильной группой.

Термин " $C_2-C_4$ -алкенил", в контексте данного документа, относится к группе из от двух до четырех атомов углерода с прямой или разветвленной цепью, содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь.

Термин " $C_2-C_7$ -алкенил", в контексте данного документа, относится к группе из от двух до семи атомов углерода с прямой или разветвленной цепью, содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь.

Термин " $C_2-C_4$ -алкенилокси", в контексте данного документа, относится к  $C_2-C_4$ -алкенильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода.

Термин " $C_1-C_3$ -алкокси", в контексте данного документа, относится к  $C_1-C_3$ -алкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода.

Термин " $C_1-C_4$ -алкокси", в контексте данного документа, относится к  $C_1-C_4$ -алкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода.

Термин " $C_1-C_6$ -алкокси", в контексте данного документа, относится к  $C_1-C_6$ -алкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода.

Термин " $C_1-C_3$ -алкокси- $C_1-C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к  $C_1-C_3$ -алкокси группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1-C_3$ -алкильную группу.

Термин " $C_1-C_6$ -алкокси- $C_1-C_6$ -алкил", в контексте данного документа, относится к  $C_1-C_6$ -алкокси группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1-C_6$ -алкильную группу.

Термин " $C_1-C_6$ -алкоксикарбонил", в контексте данного документа, относится к  $C_1-C_6$ -алкокси группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через карбонильную группу.

Термин " $C_1-C_6$ -алкоксикарбонил- $C_1-C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к  $C_1-C_6$ -алкоксикарбонильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1$ -алкильную группу.

Термин " $C_1-C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к группе, образованной из насыщенного углеводорода с прямой или разветвленной цепью, содержащего от одного до трех атомов углерода.

Термин " $C_1-C_4$ -алкил", в контексте данного документа, относится к группе, образованной из насыщенного углеводорода с прямой или разветвленной цепью, содержащего от одного до четырех атомов углерода.

Термин " $C_1-C_6$ -алкил", в контексте данного документа, относится к группе, образованной из насыщенного углеводорода с прямой или разветвленной цепью, содержащего от одного до шести атомов углерода.

Термин " $C_1-C_3$ -алкилкарбонил", в контексте данного документа, относится к  $C_1-C_3$ -алкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через карбонильную группу.

Термин " $C_1-C_3$ -алкилсульфанил", в контексте данного документа, относится к  $C_1-C_3$ -алкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через атом серы.

Термин " $C_1-C_3$ -алкилсульфанил- $C_1-C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к  $C_1-C_3$ -алкилсульфанильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1-C_3$ -алкильную группу.

Термин " $C_1-C_3$ -алкилсульфонил", в контексте данного документа, относится к  $C_1-C_3$ -алкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через сульфонильную группу.

Термин " $C_1-C_3$ -алкилсульфониламино", в контексте данного документа, относится к  $C_1-C_3$ -алкилсульфонильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через аминогруппу.

Термин "амидо", в контексте данного документа, относится к  $-C(O)NH_2$ .

Термин "амидо- $C_1-C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к амидо группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1-C_3$ -алкильную группу.

Термин "амино", в контексте данного документа, относится к  $-NH_2$ .

Термин "амино- $C_1-C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к амино группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1-C_3$ -алкильную группу.

Термин "аминосульфонил", в контексте данного документа, относится к амино группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через сульфонильную группу.

Термин "азаиндолил- $C_1-C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к азаиндолильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1-C_3$ -алкильную группу. Азаиндолильная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в этой группе.

Термин "бензотиазолил- $C_1-C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к бензотиазолильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1-C_3$ -алкильную группу. Указанная бензотиазолильная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в этой группе.

Термин "бензотиенил- $C_1-C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к бензотиенильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1-C_3$ -алкильную группу. Указанная бензотиенильная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в этой группе.

Термин "бензилокси", в контексте данного документа, относится к бензильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода.

Термин "бензилокси- $C_1-C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к бензилокси группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1-C_3$ -алкильную группу.

Термин "бифенил- $C_1-C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к бифенильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1-C_3$ -алкильную группу. Указанная бифенильная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в этой группе.

Термин "карбонил", в контексте данного документа, относится к  $-C(O)-$ .

Термин "карбоксии", в контексте данного документа, относится к  $-CO_2H$ .

Термин "карбоксии- $C_1-C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к карбоксии группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1-C_3$ -алкильную группу.

Термин "карбоксии- $C_1-C_6$ -алкил", в контексте данного документа, относится к карбоксии группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1-C_6$ -алкильную группу.

Термин "циано", в контексте данного документа, относится к  $-CN$ .

Термин " $C_3-C_{14}$ -циклоалкил", в контексте данного документа, относится к насыщенной моноциклической, бициклической или трициклической углеводородной кольцевой системе, содержащей от трех до четырнадцати атомов углерода и ноль гетероатомов.

Бициклические и трициклические кольца могут быть конденсированными, спироциклическими или мостиковыми. Типичные примеры циклоалкильных групп включают, но не ограничиваются ими, циклопропил, циклопентил, бицикло[3.1.1]гептил и адамантил.

Термин " $C_3-C_{14}$ -циклоалкилкарбонил", в контексте данного документа, относится к  $C_3-C_{14}$ -циклоалкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1-C_3$ -алкильную группу.

Термин " $C_3-C_{14}$ -циклоалкилкарбонил", в контексте данного документа, относится к  $C_3-C_{14}$ -циклоалкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через карбонильную группу.

Термин "фуранил- $C_1-C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к фуранильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1-C_3$ -алкильную группу. Указанная фуранильная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в этой группе.

Термин "фуранилкарбонил", в контексте данного документа, относится к фуранильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через карбонильную группу.

Термины "гало" и "галоген", в контексте данного документа, относятся к F, Cl, Br или I.

Термин "гало- $C_1-C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к  $C_1-C_3$ -алкильной группе, замещенной одним, двумя или тремя атомами галогена.

Термин "гало- $C_1-C_6$ -алкил", в контексте данного документа, относится к  $C_1-C_6$ -алкильной группе, замещенной одним, двумя или тремя атомами галогена.

Термин "галометил", в контексте данного документа, относится к метальной группе, замещенной одним, двумя или тремя атомами галогена.

Термин "гетероцикл" в данном документе относится к пяти-, шести- или семичленному кольцу, содержащему один, два или три гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы. Пятичленное кольцо имеет от нуля до двух двойных связей, а шести- и семичленные кольца имеют от нуля до трех двойных связей. Термин "гетероцикл" также включает бициклические группы, в которых гетероциклическое кольцо конденсировано с четырех-шестиленным ароматическим или неароматическим кар-

боциклическим кольцом или другой моноциклической гетероциклической группой. Гетероциклические группы по настоящему изобретению присоединены к исходному молекулярному фрагменту через атом углерода в группе. Примеры гетероциклических групп включают, но не ограничиваются ими, бензотиазол, фурил, имидазол, индолил, изотиазол, изоксазол, морфолин, оксазол, пиперазин, пиперидин, пирозол, пиридин, пирролин, пирролопиридин, пиррол, тиазол, тиенил и тиоморфолин.

Термин "гидрокси", в контексте данного документа, относится к -ОН.

Термин "гидрокси- $C_1$ - $C_6$ -алкил", в контексте данного документа, относится к  $C_1$ - $C_6$ -алкильной группе, замещенной одной, двумя или тремя гидроксильными группами.

Термин "имидазол- $C_1$ - $C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к имидазольной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1$ - $C_3$ -алкильную группу. Указанная имидазольная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в этой группе.

Термин "индолил- $C_1$ - $C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к индолильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1$ - $C_3$ -алкильную группу. Указанная индолильная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в этой группе.

Термин "нафтил- $C_1$ - $C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к нафтильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1$ - $C_3$ -алкильную группу. Указанная нафтильная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в этой группе.

Термин "нитро", в контексте данного документа, относится к  $-NO_2$ .

Термин " $NR^yR^y$ ", в контексте данного документа, относится к двум группам,  $R^y$  и  $R^y$ , которые присоединены к исходному молекулярному фрагменту через атом азота.  $R^y$  и  $R^y$  независимо выбраны из водорода,  $C_2$ - $C_4$ -алкенилоксикарбонила,  $C_1$ - $C_3$ -алкилкарбонила,  $C_3$ - $C_{14}$ -циклоалкилкарбонила, фурилкарбонила и фенилкарбонила.

Термин " $NR^yR^y(C_1-C_3)$ алкил", в контексте данного документа, относится к  $NR^yR^y$  группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1$ - $C_3$ -алкильную группу.

Термин " $NR^qR^t$ ", в контексте данного документа, относится к двум группам,  $R^q$  и  $R^t$ , которые присоединены к исходному молекулярному фрагменту через атом азота.  $R^q$  и  $R^t$  независимо выбраны из водорода,  $C_1$ - $C_3$ -алкила и трифенилметила.

Термин " $NR^qR^t$ -карбонил", в контексте данного документа, относится к  $NR^qR^t$  группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через карбонильную группу.

Термин " $NR^qR^t$ -карбонил- $C_1$ - $C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к  $NR^qR^t$ -карбонильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1$ - $C_3$ -алкильную группу.

Термин "фенокси", в контексте данного документа, относится к фенильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода.

Термин "фенокси- $C_1$ - $C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к фенокси группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1$ - $C_3$ -алкильную группу.

Термин "фенил- $C_1$ - $C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к фенильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1$ - $C_3$ -алкильную группу.

Термин "фенил- $C_1$ - $C_6$ -алкил", в контексте данного документа, относится к фенильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1$ - $C_6$ -алкильную группу.

Термин "фенилкарбонил", в контексте данного документа, относится к фенильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через карбонильную группу.

Термин "пиридинил- $C_1$ - $C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к пиридинильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1$ - $C_3$ -алкильную группу. Указанная пиридинильная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в этой группе.

Термин "сульфанил", в контексте данного документа, относится к -S-.

Термин "сульфонил", в контексте данного документа, относится к  $-SO_2$ -.

Термин "тиазол- $C_1$ - $C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к тиазольной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1$ - $C_3$ -алкильную группу. Указанная тиазольная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в этой группе.

Термин "тиенил- $C_1$ - $C_3$ -алкил", в контексте данного документа, относится к тиенильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через  $C_1$ - $C_3$ -алкильную группу. Указанная тиенильная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в этой группе.

Термин "лечение" относится к (i) предотвращению возникновения заболевания, расстройства или состояния у пациента, который может быть предрасположен к этому заболеванию, расстройству и/или

состоянию, но еще не диагностирован как имеющий его; (ii) ингибированию заболевания, расстройства или состояния, т.е. прекращению его развития; и (iii) облегчению заболевания, расстройства или состояния, т.е. вызванию регресса заболевания, расстройства и/или состояния и/или симптомов, связанных с заболеванием, расстройством и/или состоянием.

Связывание макроциклических пептидов с PD-L1 может быть измерено, например, с помощью таких методов, как гомогенная флуоресценция с временным разрешением (HTRF), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), изотермическая титровальная калориметрия (ИТС), ядерная магнитно-резонансная спектроскопия (ЯМР), и тому подобное. Кроме того, связывание макроциклических пептидов с PD-L1, экспрессируемое на поверхности клеток, можно измерить, как описано здесь в клеточных анализах связывания.

Введение терапевтического агента, описанного здесь, включает, без ограничения, введение терапевтически эффективного количества терапевтического агента. Термин "терапевтически эффективное количество", в контексте данного документа, относится, без ограничения, к количеству терапевтического агента для лечения или предотвращения состояния, подающегося лечению путем введения композиции ингибиторов связывания PD-1/PD-L1, описанных здесь. Это количество представляет собой количество, достаточное для проявления обнаруживаемого терапевтического, или профилактического, или благоприятного эффекта. Эффект может включать, например, и без ограничения, лечение или предотвращение перечисленных здесь состояний. Точное эффективное количество для субъекта будет зависеть от габаритов и состояния здоровья субъекта, характера и степени тяжести состояния, подвергаемого лечению, рекомендаций лечащего врача, и терапевтических средств или комбинации терапевтических средств, выбранных для введения. Таким образом, нецелесообразно указывать точное эффективное количество заранее.

В другом аспекте изобретение относится к способам ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта с использованием макроциклических пептидов по настоящему изобретению. Как показано здесь, макроциклические пептиды по настоящему изобретению способны связываться с PD-L1, нарушая взаимодействие между PD-L1 и PD-1, конкурируя со связыванием PD-L1 с моноклональными антителами против PD-1, которые, как известно, блокируют взаимодействие с PD-1, усиливая ЦМВ-специфичную Т-клеточную секрецию IFN $\gamma$ , и усиление ВИЧ-специфичной Т-клеточной секреции IFN $\gamma$ . В результате макроциклические пептиды по настоящему изобретению полезны для модификации иммунного ответа, лечения таких заболеваний, как рак или инфекционное заболевание, стимулирования защитного аутоиммунного ответа или стимуляции антигенспецифических иммунных ответов (например, путем совместного введения PD-L1 блокирующих пептидов с представляющим интерес антигеном).

Для того, чтобы настоящее изобретение могло быть более понятным, сначала раскрываются некоторые термины. Дополнительные определения излагаются по всему описанию изобретения.

Термины "лиганд 1 запрограммированной смерти", "лиганд 1 запрограммированной смерти клетки", "белок PD-L1", "PD-L1", "PDL1", "PDCDL1", "hPD-L1", "hPD-L1", "CD274" и "B7-H1" используются взаимозаменяемо, и включают варианты, изоформы, гомологи видов человеческого PD-L1 и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с PD-L1. Полная последовательность PD-L1 может быть найдена под номером GENBANK® № NP 054862.

Термины "запрограммированная смерть 1", "запрограммированная смерть клетки 1", "белок PD-1", "PD-1", "PD1", "PDCD1", "hPD-1" и "hPD-1" используются взаимозаменяемо, и включают варианты, изоформы, гомологи видов PD-1 человека и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с PD-1. Полную последовательность PD-1 можно найти под номером GENBANK® № U64863. Термины "цитотоксический антиген-4, ассоциированный с Т-лимфоцитом", "CTLA-4", "CTLA4", "CTLA-4-антиген" и "CD152" (см., например, Murata, *Am. J. Pathol.*, 155:453-460 (1999)) используются взаимозаменяемо, и включают варианты, изоформы, гомологи видов CTLA-4 человека и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с CTLA-4 (см., например, Balzano, *Int. J. Cancer Suppl.*, 7:28-32 (1992)). Полную последовательность нуклеиновой кислоты CTLA-4 можно найти под номером GENBANK® L15006.

Термин "иммунный ответ" относится к действию, например, лимфоцитов, антигенпрезентирующих клеток, фагоцитарных клеток, гранулоцитов и растворимых макромолекул, продуцируемых вышеуказанными клетками или печенью (включая макроциклические пептиды, цитокины и комплемент), что приводит к селективному повреждению, уничтожению или выведению из организма человека инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковыми клетками, или, в случае аутоиммунной реакции или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей.

"Неблагоприятное событие" (АЕ) в контексте данного документа является любым неблагоприятным и обычно непреднамеренным, даже нежелательным знаком (включая аномальные лабораторные исследования), симптомом или заболеванием, связанным с применением терапевтического лечения. Например, неблагоприятное событие может быть связано с активацией иммунной системы или увеличением количества клеток иммунной системы (например, Т-клеток) в ответ на лечение. Терапевтическое лечение может иметь один или несколько связанных АЕ, и каждое АЕ может иметь одинаковую или различную степень тяжести. Ссылка на способы, способные "изменять неблагоприятные события", означает режим лечения, который снижает заболеваемость и/или тяжесть одного или нескольких АЕ, связанных с исполь-

зованием другого режима лечения. В контексте данного документа, термин "гиперпролиферативное заболевание" относится к состояниям, при которых рост клеток превышает нормальные уровни. Например, гиперпролиферативные заболевания или расстройства включают злокачественные заболевания (например, рак пищевода, рак толстой кишки, рак желчного пузыря) и доброкачественные заболевания (например, атеросклероз, доброкачественная гиперплазия и доброкачественная гипертрофия предстательной железы).

В контексте данного документа, термин "около" или "содержащий по существу" означает в допустимом диапазоне погрешностей для конкретного значения, определенное специалистом в данной области техники, которое будет частично зависеть от того, как измеряется или определяется значение, т.е. ограничения измерительной системы. Например, "около" или "содержащий по существу" может означать в пределах одного или более стандартного отклонения для практики в данной области техники. Альтернативно, "около" или "содержащий по существу" может означать диапазон до 20%. Кроме того, особенно в отношении биологических систем или способов, термины могут означать до определенного порядка величины или до 5 раз больше величины. Когда в заявке и формуле изобретения указаны конкретные значения, если не указано иное, значение "около" или "содержащий по существу" следует считать находящимся в пределах допустимого диапазона ошибки для данного конкретного значения.

Как описано здесь, любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон отношения или целочисленный диапазон следует понимать как включающий значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и, когда это необходимо, его долей (таких как одна десятая и одна сотая целого числа), если не указано иное.

#### Конкурентный анализ.

Настоящее изобретение также относится к макроциклическим пептидам, которые способны конкурировать со связыванием эталонного антитела против PD-L1 (MDX-1105), по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% и по меньшей мере на около 100%. Такие макроциклические пептиды могут разделять структурную гомологию с одним или более макроциклическими пептидами, описанными здесь, включая мутантную, консервативную замену, функциональное замещение и делеционные формы при условии, что они специфически связываются с PD-L1. Например, если макроциклический пептид связывается по существу с той же областью PD-L1, что и эталонное анти-PD-L1-антитело, макроциклический пептид должен связываться с эпитопом PD-L1, который, по меньшей мере, перекрывается с эпитопом PD-L1, с которым связывается моноклональное анти-PD-L1 антитело. Область перекрывания может варьироваться от одного аминокислотного остатка до нескольких сотен аминокислотных остатков. Затем макроциклический пептид должен конкурировать и/или блокировать связывание моноклонального анти-PD-L1 антитела с PD-L1 и, тем самым, уменьшать связывание моноклонального анти-PD-L1 антитела с PD-L1, предпочтительно по меньшей мере на около 50% в конкурентном анализе.

Анти-PD-L1 антитела, которые могут быть использованы в качестве эталонных антител для целей конкурентного анализа, известны в данной области техники. Например, могут использоваться следующие типичные антитела против PD-L1: MDX-1105 (BMS); L01X-C (Serono), L1X3 (Serono), MSB-0010718C (Serono) и PD-L1 Probody (CytomX) и PD-L1 антитела, описанные соавторами в WO 2007/005874.

Анти-PD-1 антитела, которые могут быть использованы в качестве эталонных антител для целей конкурентного анализа, известны в данной области техники. Например, могут быть использованы следующие типичные антитела против PD-1: ниволумаб (BMS); 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 и 5F4, каждое из которых описано соавторами в патенте США № 8008449 (BMS), МК-3475 (Merck, описанное в патенте США № 8168757) и антитела, описанные в патенте США № 7488802.

#### Фармацевтические композиции.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к композиции, например, фармацевтической композиции, содержащей один или комбинацию макроциклических пептидов по настоящему изобретению, составленную с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать один или комбинацию (например, двух или более разных) макроциклических пептидов, или иммуноконъюгатов, или биспецифичных молекул по изобретению. Например, фармацевтическая композиция по изобретению может содержать комбинацию макроциклических пептидов (или иммуноконъюгатов, или биспецифичных молекул), которые связываются с различными эпитопами на целевом антигене, или которые имеют комплементарные активности.

Фармацевтические композиции по изобретению также могут быть введены в комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими агентами. Например, комбинированная терапия может включать макроциклический пептид, объединенный по меньшей мере с одним другим противовоспалительным агентом или иммунодепрессантом. Примеры терапевтических агентов, которые могут быть использованы в комбинированной терапии, более подробно описаны ниже в разделе, посвященном применению макроциклических пептидов по изобретению.

В контексте данного документа, термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые

и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические агенты и агенты, задерживающие абсорбцию, и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно, указанный носитель является подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения активное вещество, т.е. макроциклический пептид, иммуноконъюгат или биспецифичная молекула, может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические соединения по изобретению могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. Термин "фармацевтически приемлемая соль" или "терапевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения и не оказывает нежелательного токсического воздействия (см., например, Berge, S.M. et al., *J. Pharm. Sci.*, 66:1-19 (1977)).

Примеры таких солей включают соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Соли присоединения кислоты включают соли, полученные из нетоксичных неорганических кислот, таких как хлористоводородная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, иодистоводородная, фосфорная и тому подобное, а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфокислоты, и тому подобное. Соли присоединения основания включают соли, полученные из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций, и тому подобное, а также из нетоксичных органических аминов, таких как N,N-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин, и тому подобное.

Фармацевтическая композиция по изобретению также может включать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеин гидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия, и тому подобное; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропиленгаллат, альфа-токоферол, и тому подобное; и (3) металл-хелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота, и тому подобное.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Соответствующую требованиям текучесть можно поддерживать, например, путем использования материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции могут также содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено как методами предварительной стерилизации, так и путем включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и тому подобного. Также может быть желательным включать в композиции изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и тому подобное. Кроме того, пролонгированная абсорбция фармацевтической формы для инъекций может быть вызвана включением агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных растворов для инъекций или дисперсии. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда любые типичные среды или агент несовместимы с активным соединением, предполагается их применение в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и тому подобное) и их подходящие смеси. Соответствующую требованиям текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительным включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может

быть достигнута путем включения в состав агента, который замедляет абсорбцию, например, моностеаратные соли и желатин.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения активного соединения в требуемом количестве в подходящем растворителе с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, если необходимо, с последующей стерилизационной микрофилтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием (лиофилизация), с помощью которых получают порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного желаемого ингредиента из его предварительно фильтрованного через стерилизующие фильтры раствора.

Количество активного ингредиента, которое можно соединять с материалом-носителем для получения единичной лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от субъекта, подвергаемого лечению, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с веществом-носителем для получения единичной лекарственной формы, обычно будет представлять собой такое количество композиции, которое вызывает терапевтическое действие. Как правило, из расчета на 100%, данное количество будет колебаться от около 0,01 до около 99% активного ингредиента, предпочтительно от около 0,1 до около 70%, наиболее предпочтительно от около 1 до около 30% активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Схемы дозирования регулируют для обеспечения оптимальной желаемой ответной реакции (например, терапевтического ответа). Например, можно ввести один болюс, можно на протяжении времени вводить несколько отдельных доз, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Особенно предпочтительно составлять парентеральные композиции в виде единичной дозированной лекарственной формы для легкости введения и равномерности дозирования. Единичная дозированная лекарственная форма в контексте данного документа относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического действия в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Подробное описание единичных препаративных лекарственных форм по изобретению диктуется и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического действия, которое должно быть достигнуто, и (b) ограничений, присущих в данной области компаундированию такого активного соединения, для лечения чувствительности у индивидуумов.

Для введения макроциклического пептида режим дозирования варьируется от около 0,0001 до 100 мг/кг и более обычно от 0,01 до 5 мг/кг массы тела пациента. Например, режимы дозирования 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 в пределах 1-10 мг/кг. Примерный режим лечения предусматривает введение один раз в день, два раза в день, раз в две недели, три раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, один раз в месяц, один раз каждые 3 месяца или один раз в каждые от трех до шести месяцев. Предпочтительные режимы дозирования для макроциклического пептида по настоящему изобретению включают 1 мг/кг массы тела или 3 мг/кг массы тела при внутривенном введении, причем макроциклический пептид назначают с использованием одной из следующих схем приема препарата: (i) каждые четыре недели для шести доз, затем каждые три месяца; (ii) каждые три недели; (iii) 3 мг/кг массы тела однократно, после чего 1 мг/кг массы тела каждые три недели.

В некоторых способах вводят одновременно два или более макроциклических пептида с различной специфичностью связывания, в этом случае дозировка каждого вводимого соединения находится в пределах указанных диапазонов. Соединения обычно вводят многократно. Интервалы между разовыми дозами могут быть, например, еженедельно, ежемесячно, каждые три месяца или ежегодно. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывают измерения уровня макроциклического пептида в крови к целевому антигену у пациента. В некоторых способах дозирование регулируется для достижения концентрации в плазме около 1-1000 мкг/мл и в некоторых способах около 25-300 мкг/мл.

В качестве альтернативы, макроциклический пептид может быть введен в виде композиции с замедленным высвобождением, в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота введения могут варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических применениях относительно низкая доза вводится с относительно большими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение всю оставшуюся жизнь. В терапевтических применениях иногда требуется относительно высокая доза с относительно короткими интервалами, пока прогрессирование болезни не будет уменьшено или прекращено, и предпочтительно до тех пор, пока пациент не продемонстрирует частичное или полное уменьшение интенсивности симптомов заболевания. После этого пациент может быть введен профилактический режим. Фактические уровни дозирования активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться таким образом, чтобы получить количе-

ство активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозирования будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных композиций по настоящему изобретению или их сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, скорость экскреции конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными применяемыми составами, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предысторию болезни пациента, подлежащего лечению, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

"Терапевтически эффективная доза" макроциклического пептида по изобретению предпочтительно приводит к уменьшению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращению ухудшения или инвалидности вследствие болезни. Например, для лечения опухолей "терапевтически эффективная доза" предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере на около 20%, более предпочтительно по меньшей мере на около 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на около 60% и еще более предпочтительно по меньшей мере на около 80% относительно субъектов, не подвергавшихся лечению. Способность соединения ингибировать рост опухоли и/или HIV может быть оценена на экспериментальной модельной системе на животных, прогнозирующей эффективность в опухолях человека или силу воздействия на вирусы. Альтернативно, это свойство композиции можно оценить, исследуя способность соединения ингибировать *in vitro* с помощью анализов, известных квалифицированному практику. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшить размер опухоли, уменьшить вирусную нагрузку или иным образом улучшить симптомы у субъекта. Специалист в данной области может определить такие количества на основе таких факторов, как размер субъекта, степень тяжести симптомов субъекта и конкретная композиция или выбранный способ введения.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к фармацевтическому составному комплексу, содержащему макроциклический пептид и другой иммуномодулятор, как описано здесь. Комплект может также содержать инструкции для использования при лечении гиперпролиферативного заболевания (такого как рак, как описано здесь) и/или вирусного заболевания.

Композиция по настоящему изобретению может быть введена одним или несколькими путями введения с использованием одного или нескольких из множества способов, известных в данной области. Как будет понятно специалисту в данной области, путь и/или способ введения будет варьироваться в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения для макроциклических пептидов по изобретению включают внутривенный, внутримышечный, внутрискожный, внутривнутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, с помощью инъекции или инфузии. Фраза "парентеральное введение" в контексте данного документа означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриаортальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутривнутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, внутрискожную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратеральную инъекцию и инфузию. Альтернативно, макроциклический пептид по изобретению может быть введен непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения могут быть получены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, такие как композиция с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Могут использоваться биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Многие способы получения таких композиций запатентованы или в общем известны специалистам в данной области техники. См., например, Robinson, J.R., ed., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York (1978).

Терапевтические композиции могут быть введены с помощью медицинских устройств, известных в данной области. Например, в предпочтительном варианте осуществления терапевтическая композиция по изобретению может быть введена с помощью устройства для инъекций без иглы, таких как устройства, раскрытые в патентах США № 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824 или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей, используемых в настоящем описании, включают: патент США № 4487603, в котором раскрыт имплантируемый микроинфузионный насос для дозирования лекарств с контролируемой скоростью; патент США 4486194, который раскрывает терапевтическое устройство для введения лекарственного средства через кожу; патент США 4447233, в котором раскрыт инфузионный насос для доставки лекарственного средства с высокой скоростью инфузии; патент США 4447224, в котором раскрыта имплантируемая инфузионная система с регулятором расхода для непрерывной доставки лекарственного средства; патент США 4439196, в котором раскрыта осмотическая сис-

тема доставки лекарственного средства, имеющая многокамерные отсеки; и патент США 4475196, который раскрывает осмотическую систему доставки лекарственного средства. Эти патенты включены в настоящий документ посредством ссылки. Многие другие подобные имплантаты, системы доставки и модели известны специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления макроциклические пептиды по изобретению могут быть сформулированы для обеспечения правильного распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (БВВ) не пропускает многие высокогидрофильные соединения. Чтобы гарантировать, что терапевтические соединения по изобретению проходят через БВВ (если желательно), они могут быть сформулированы, например, в липосомах. Способы изготовления липосом см., например, в патентах США № 4522811, 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать одну или несколько фрагментов, которые избирательно переносятся в определенные клетки или органы, тем самым улучшая целевую доставку лекарственного средства (см., например, Ranade, V.V., *J. Clin. Pharmacol.*, 29:685 (1989)). Типичные целевые фрагменты включают фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016 на имя Low et al.); 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 протеина А (Briscoe et al., *Am. J. Physiol.*, 1233:134 (1995)); р120 (Schreier et al., *J. Biol. Chem.*, 269:9090 (1994)); см. также Keinanen, K. et al., *FEBS Lett.*, 346:123 (1994); Killion, J.J. et al., *Immunomethods* 4:273 (1994).

Применение и способы согласно изобретению.

Макроциклические пептиды, композиции и способы согласно настоящему изобретению имеют многочисленные *in vitro* и *in vivo* применения, включающие, например, обнаружение PD-L1 или усиление иммунного ответа посредством блокады PD-L1. Например, эти молекулы могут быть введены в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или человеческим субъектам, например *in vivo*, для усиления иммунитета в различных ситуациях. Соответственно, в одном аспекте изобретение относится к способу модификации иммунного ответа у субъекта, включающему введение субъекту макроциклического пептида по изобретению таким образом, что иммунный ответ у субъекта модифицируется. Предпочтительно, ответ усиливается, стимулируется или активируется. В других вариантах осуществления изобретения макроциклический пептид может обладать антисупо (яванского макака), антимишиной и/или антисурковой связывающей и терапевтической активностью.

В контексте данного документа, термин "субъект" включает человека и животных, отличных от человека. Животные, отличные от человека, включают в себя всех позвоночных животных, например млекопитающих и не млекопитающих, таких как нечеловеческие приматы, овцы, собаки, кошки, коровы, лошади, куры, сурки, земноводные и рептилии, хотя предпочтительными являются млекопитающие, такие как нечеловеческие приматы, овцы, собаки, кошки, коровы и лошади. Предпочтительные субъекты включают пациентов-людей, нуждающихся в улучшении иммунного ответа. Способы по изобретению особенно подходят для лечения пациентов-людей, имеющих расстройство, которое может лечиться путем усиления опосредованного Т-клетками иммунного ответа. В конкретном варианте осуществления изобретения способы особенно подходят для лечения раковых клеток *in vivo*. Для достижения антигенспецифического усиления иммунитета макроциклические пептиды можно вводить вместе с представляющим интерес антигеном. При введении макроциклических пептидов PD-L1 совместно с другим агентом они могут быть введены в любом порядке или одновременно.

Изобретение также относится к способам обнаружения присутствия в образце антигена PD-L1 человека, сурка, супо и/или мыши, или измерения количества PD-L1 антигена человека, сурка, супо и/или мыши, включающим контактирование образца и контрольного образца с эталонным макроциклическим пептидом, который специфически связывается с человеческим, сурковым, супо и/или мышинным PD-L1, в условиях, которые позволяют образовывать комплекс между макроциклом и человеческим, сурковым, супо и/или мышинным PD-L1. Затем определяется образование комплекса, где различие комплексного образования между образцом по сравнению с контрольным образцом свидетельствует о наличии в образце антигена PD-L1 человека, сурка, супо и/или мыши. Учитывая специфическое связывание макроциклических пептидов настоящего изобретения для PD-L1 по сравнению с CD28, ICOS и CTLA-4, макроциклические пептиды, описанные здесь, могут быть использованы для специфического определения экспрессии PD-L1 на поверхности клеток и, кроме того, для очистки PD-L1 с помощью иммуноаффинной очистки.

Онкологическое заболевание.

Блокада PD-1 макроциклическими пептидами может усилить иммунный ответ на раковые клетки у пациента. Лиганд для PD-1, PD-L1 не экспрессируется в нормальных клетках человека, но в изобилии встречается в различных раковых опухолях человека (Dong et al., *Nat. Med.*, 8:787-789 (2002)). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 приводит к уменьшению числа опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов, уменьшению пролиферации, опосредованной Т-клеточным рецептором, и уклонению раковых клеток от иммунного ответа (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 обратима путем ингибирования локального взаимодействия PD-1 с PD-L1, и эффект является

аддитивным, когда также блокируется взаимодействие PD-1 с PD-L2 (Iwai et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 99:12293-12297 (2002); Brown et al., J. Immunol., 170:1257-1266 (2003)). Хотя предыдущие исследования показали, что пролиферация Т-клеток может быть восстановлена путем ингибирования взаимодействия PD-1 с PD-L1, не было сообщений о прямом влиянии на рост опухоли рака *in vivo* блокированием взаимодействия PD-1/PD-L1. В одном аспекте настоящее изобретение относится к лечению субъекта *in vivo* с использованием макроциклического пептида таким образом, что ингибируется рост злокачественных опухолей. Макроциклический пептид можно использовать отдельно для ингибирования роста злокачественных опухолей. Альтернативно, макроциклический пептид можно использовать в сочетании с другими иммуногенными агентами, стандартными методами лечения рака или другими макроциклическими пептидами, как описано ниже.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества макроциклического пептида. Предпочтительные виды раковых опухолей, рост которых может быть ингибирован применением макроциклических пептидов, включают в себя раковые опухоли, как правило, реагирующие на иммунотерапию. Неограничивающие примеры предпочтительных видов раковых опухолей для лечения включают меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), почечно-клеточную карциному (например, светлоклеточную карциному), рак предстательной железы (например, гормонорезистентную аденокарциному предстательной железы и кастрационно-резистентный рак предстательной железы), рак молочной железы, колоректальный рак и рак легких (например, сквамозный и несквамозный немелкоклеточный рак легких). Кроме того, изобретение включает рефрактерные или рецидивирующие злокачественные опухоли, рост которых может быть ингибирован применением макроциклических пептидов по изобретению. Примеры других видов рака, которые можно лечить с использованием способов по изобретению, включают рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, рак яичников, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка/желудочно-кишечного тракта, рак яичек, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак щитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, хронические или острые лейкозы, включая острый миелолейкоз, хронический миелолейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфолейкоз, плотные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль спинного мозга, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, вызванные окружающей средой раковые новообразования, в том числе индуцированные асбестом, и комбинации указанных видов рака. Настоящее изобретение также полезно для лечения метастатических видов рака, особенно метастатических видов рака, которые экспрессируют PD-L1 (Iwai et al., Int. Immunol., 17:133-144(2005)).

Необязательно, макроциклические пептиды к PD-L1 могут быть объединены с иммуногенным агентом, таким как раковые клетки, очищенные опухолевые антигены (включая рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al., J. Immunol., 173:4919-4928 (2004)). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые могут быть использованы, включают пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназа, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (обсуждается далее ниже). Было показано, что у людей некоторые опухоли являются иммуногенными, такими как меланомы. Предполагается, что, повышая порог активации Т-клеток посредством блокады PD-L1, можно ожидать активации опухолевого ответа у хозяина.

Блокада PD-L1, вероятно, будет наиболее эффективной в сочетании с протоколом вакцинации. Было разработано много экспериментальных стратегий вакцинации против опухолей (см. 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); см. также Restifo, N. et al., Cancer Vaccines, Chapter 61, pp. 3023-3043, в DeVita, V. et al., eds., Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition (1997)). В одной из этих стратегий вакцина готовится с использованием аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что эти клеточные вакцины наиболее эффективны при трансдукции опухолевых клеток для экспрессии GM-CSF. Было показано, что GM-CSF является мощным активатором представления антигена для противоопухолевой вакцинации (Dranoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 3539-3543 (1993)).

Изучение экспрессии генов и крупномасштабных моделей экспрессии генов в различных опухолях привело к определению так называемых опухолеспецифических антигенов (Rosenberg, S.A., Immunity, 10:281-287 (1999)). Во многих случаях эти опухолеспецифические антигены являются дифференциро-

ванными антигенами, экспрессируемыми в опухолях и в клетке, из которой возникла опухоль, например, антигены меланоцитов gp100, антигены MAGE и Trp-2. Что более важно, многие из этих антигенов, как можно показать, являются мишенями опухолеспецифических Т-клеток, обнаруженных в хозяине. Блокада PD-L1 может использоваться в сочетании с набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессированных в опухоли, с целью генерации иммунного ответа на эти белки. Эти белки, как правило, рассматриваются иммунной системой как собственные антигены и поэтому толерантны по отношению к ним. Опухолевый антиген может также включать белок теломеразу, который необходим для синтеза теломер хромосом и который экспрессируется в более чем 85% раковых опухолей человека и 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", экспрессируемые в раковых клетках из-за соматических мутаций, которые изменяют последовательность белка или создают слитые белки между двумя несвязанными последовательностями (т.е. bcr-abl в хромосоме Филадельфия) или идиотипом из В-клеточных опухолей.

Другие опухолевые вакцины могут включать белки вирусов, вовлеченных в рак человека, таких как вирус папилломы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус саркомы герпеса Капоши (KHSV). Другой формой опухолеспецифического антигена, который можно использовать в сочетании с блокадой PD-L1, являются очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные из самой опухолевой ткани. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток и очень эффективны при доставке в антигенпрезентирующие клетки для устранения 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 сильные антигенпрезентирующие клетки, которые могут быть использованы для инициирования антигенспецифических ответов. DC могут быть получены *ex vivo* и загружены различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle, F. et al., *Nat. Med.*, 4:328-332 (1998)). DC также могут быть трансдуцированы генетическими средствами для экспрессии указанных опухолевых антигенов. DC были также слиты непосредственно с опухолевыми клетками с целью иммунизации (Kugler, A. et al., *Nat. Med.*, 6:332-336 (2000)). В качестве способа вакцинации иммунизация DC может эффективно сочетаться с блокадой PD-L1 для активации более мощных противоопухолевых ответов.

Блокада PD-L1 также может сочетаться со стандартными способами лечения рака. Блокада PD-L1 может эффективно сочетаться с химиотерапевтическими режимами. В этих случаях возможно уменьшить дозу введенного химиотерапевтического агента (Mokyr, M. et al., *Cancer Res.*, 58:5301-5304 (1998)). Примером такой комбинации является макроциклический пептид в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другим примером такой комбинации является макроциклический пептид в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научное обоснование совместного использования блокады PD-L1 и химиотерапии заключается в том, что гибель клеток, являющаяся следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить к увеличению уровней опухолевого антигена на антигенпрезентирующем пути. Другие комбинированные терапии, которые могут привести к синергизму с блокадой PD-L1 путем гибели клеток, это радиация, хирургия и гормональная недостаточность. Каждый из этих протоколов создает источник опухолевого антигена в хозяине. Ингибиторы ангиогенеза также могут быть объединены с блокадой PD-L1. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, которые могут направлять опухолевый антиген на пути антигенпрезентирования у хозяина. Блокирующие макроциклические пептиды PD-L1 также могут быть использованы в комбинации с биспецифическими макроциклическими пептидами, которые нацеливают эффекторные экспрессирующие Fc альфа или Fc гамма-рецепторы клетки на опухолевые клетки (см., например, патенты США № 5922845 и 5837243). Биспецифические макроциклические пептиды могут использоваться для нацеливания на два отдельных антигена. Например, анти-Fc-рецептор/антиопухолевый антиген (например, Her-2/neu) биспецифические макроциклические пептиды были использованы для нацеливания макрофагов на сайты опухоли. Это нацеливание может более эффективно активировать специфические опухолевые ответы. Т-клеточный ответ был бы дополнен использованием блокады PD-L1. Альтернативно, антиген может быть доставлен непосредственно в DC путем использования биспецифических макроциклических пептидов, которые связываются с опухолевым антигеном и маркером клеточной поверхности на дендритной клетке. Опухоли уклоняются от иммунного контроля хозяина с помощью множества разнообразных механизмов. Многие из этих механизмов могут быть преодолены путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммуносупрессорными. К ним относятся, в частности, 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)). Макроциклические пептиды к каждому из этих совокупностей могут использоваться в комбинации с анти-PD-L1 для противодействия эффектам иммуносупрессорного агента и для поддержки иммунных ответов опухоли хозяином.

Другие макроциклические пептиды, которые могут быть использованы для активации иммунного ответа хозяина, могут использоваться в комбинации с анти-PD-L1. К ним относятся молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и антигенпрезентирование. Макроцик-

лические пептиды анти-CD40 способны эффективно замещать активность Т-хелперных клеток (Ridge, J. et al., *Nature*, 393:474-478 (1998)) и могут использоваться в сочетании с антителами PD-1 (Ito, N. et al., *Immunobiology*, 201(5):527-540 (2000)). Активация макроциклических пептидов в костимулирующие молекулы Т-клеток, такие 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 обеспечивать повышенные уровни активации Т-клеток.

Трансплантация костного мозга в настоящее время используется для лечения различных опухолей гемопоэтического происхождения. В то время как заболевание трансплантат против хозяина является следствием такого лечения, терапевтическая польза может быть получена от ответов трансплантат против опухоли. Блокада PD-L1 может использоваться для повышения эффективности трансплантированных от донора опухолеспецифических Т-клеток.

Существует также несколько экспериментальных протоколов лечения, которые включают активацию *ex vivo* и увеличение числа антигенспецифических Т-клеток и адаптивную передачу этих клеток реципиентам для получения антигенспецифических Т-клеток против опухоли (Greenberg, R. et al., *Science*, 285:546-551 (1999)). Эти методы также могут быть использованы для активации Т-клеточных ответов на инфекционные агенты, такие как ЦМВ. Можно ожидать, что активация *ex vivo* в присутствии макроциклических пептидов увеличивает частоту и активность адаптивно переданных Т-клеток.

Инфекционные заболевания.

Другие способы раскрытия используются для лечения пациентов, подвергшихся воздействию определенных токсинов или патогенов. Соответственно, еще один аспект настоящего изобретения представляет собой способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту макроциклического пептида по настоящему изобретению, в результате чего субъект лечится от инфекционного заболевания. Подобно ее применению к опухолям, как обсуждалось выше, блокада PD-L1 может использоваться отдельно или в качестве адъюванта в сочетании с вакцинами для стимуляции иммунного ответа на патогены, токсины и аутоантигены. Примерами патогенов, для которых этот терапевтический подход может быть особенно полезен, являются патогены, для которых в настоящее время нет эффективной вакцины, или патогены, для которых стандартные вакцины менее эффективны. К ним относятся, но не ограничиваются ими, ВИЧ, гепатит (А, В и С), грипп, герпес, лямблии, малярия (Butler, N.S. et al., *Nature Immunology* 13, 188-195 (2012), Hafalla, J.C.R., et al. *PLOS Pathogens*; February 2, 2012)), *Leishmania*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*. Блокада PD-L1 особенно полезна против установленных инфекций, вызванных такими агентами, как ВИЧ, которые представляют собой измененные антигены в процессе инфекций. Эти новые эпитопы распознаются как чужеродные во время введения античеловеческого PD-L1, провоцируя, таким образом, сильную Т-клеточную реакцию, которая не заглушается негативными сигналами через PD-1.

Некоторые примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению способами по изобретению, включают ВИЧ, гепатит (А, В или С), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV), вирус Эпштейна-Барр), аденовирус, вирус гриппа, флавивирусы, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, короновирус, респираторно-синцитиальный вирус, вирус паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус коровьей оспы, вирус HTLV, вирус лихорадки Денге, папилломавирус, вирус контагиозного моллюска, полиовирус, вирус бешенства, вирус JC (прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия) и вирус арбовирусного энцефалита. Некоторые примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению способами по изобретению, включают хламидии, риккетсиальные бактерии, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки, клебсиеллу, протеус, сerratии, псевдомонады, легионеллы, дифтерию, сальмонеллы, бактерии, вызывающие холеру, столбняк, ботулизм, сибирскую язву, чуму, лептоспироз и болезнь Лайма.

Некоторые примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению способами по изобретению, включают *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т. д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т. д.), Genus *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizophus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

Некоторые примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению способами по изобретению, включают *Entamoeba histolytica*, *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 вышеперечисленных способах блокада PD-L1 может быть объединена с другими формами иммунотерапии, такими как лечение цитокинами (например, интерферонами, агентами, нацеленными на активность VEGF или VEGF-рецепторы, GM-CSF, G-CSF, IL-2), или терапия с использованием биспецифических антител, которая обеспечивает усиленную презентацию опухолевых антигенов (см., 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 реакции. Действительно, индукция противоопухолевых реакций с использованием опухолевых клеток и пептидных вак-

цин выявила, что многие противоопухолевые реакции включают аутореактивность (депигментацию, наблюдаемую в анти-CTLA-4+GM-CSF модифицированной меланоме B16 в van Elsas et al. выше; депигментацию в вакцинированных Trp-2 мышях (Overwijk, W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:2982-2987 (1999)), аутоиммунный простатит, индуцированный противоопухолевыми вакцинами TRAMP (Hurwitz, A., supra (2000)), вакцинацией пептидным антигеном меланомы и витилиго, наблюдаемые в клинических исследованиях на человеке (Rosenberg, S.A. et al., J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol., 19(1):81-84 (1996)).

Таким образом, возможно рассмотреть использование анти-PD-L1 блокады в сочетании с различными собственными белками, чтобы разработать протоколы вакцинации, чтобы эффективно вызывать иммунные реакции против этих собственных белков для лечения заболеваний. Например, болезнь Альцгеймера включает неадекватное накопление пептида (бета-амилоида, A $\beta$ ) в амилоидных отложениях в головном мозге; выработка антител к амилоиду способна очищать эти амилоидные отложения (Schenk et al., Nature, 400:173-177 (1999)).

Другие собственные белки могут также использоваться в качестве мишеней, таких как IgE, для лечения аллергии и астмы, и TNF.alpha для ревматоидного артрита. Наконец, реакции антител на различные гормоны могут быть индуцированы использованием описанных здесь макроциклов. Реакции нейтрализующих антител на репродуктивные гормоны могут быть использованы для контрацепции. Может быть также использована реакция нейтрализующих антител на гормоны и другие растворимые факторы, которые необходимы для роста конкретных опухолей и могут также рассматриваться как возможные мишени вакцинации.

Способы, аналогичные описанным выше для использования анти-PD-L1 макроциклов, могут быть использованы для индукции терапевтических аутоиммунных реакций для лечения пациентов, имеющих нежелательное накопление других аутоантигенов, таких как амилоидные отложения, включая A $\beta$  при болезни Альцгеймера, цитокины, такие как TNF.alpha и IgE.

#### Вакцины.

Макроциклические пептиды могут быть использованы для стимуляции антигенспецифических иммунных реакций совместным введением анти-PD-1 макроцикла с представляющим интерес антигеном (например, вакциной). Таким образом, в другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ усиления иммунной реакции на антиген у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту: (i) данного антигена; и (ii) анти-PD-1 макроцикла таким образом, что иммунная реакция на данный антиген у субъекта усиливается. Антигеном может быть, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген из патогена. Неограничивающие примеры таких антигенов включают антигены, обсуждаемые в разделах выше, такие как опухолевые антигены (или противоопухолевые вакцины), обсуждаемые выше, или антигены из вирусов, бактерий или других патогенов, описанные выше. Подходящие пути введения композиций (например, макроциклических пептидов, полиспецифических и биспецифических молекул или иммуноконъюгатов) по настоящему изобретению *in vivo* и *in vitro* хорошо известны в данной области и могут быть выбраны специалистами в данной области. Например, такие композиции могут вводиться путем инъекции (например, внутривенной или подкожной). Подходящие дозы используемых молекул будут зависеть от возраста и массы субъекта и концентрации и/или рецептуры композиции.

Как описано выше, макроциклические пептиды по настоящему изобретению могут вводиться совместно с одним или несколькими другими терапевтическими агентами, например, цитотоксическим агентом, радиотоксическим агентом или иммуносупрессивным агентом. Пептид может быть связан с данным агентом (в виде иммунокомплекса) или может быть введен отдельно от данного агента. В последнем случае (в случае отдельного введения) указанный пептид может быть введен до, после или совместно с указанным агентом или может быть введен совместно с другими известными терапиями, например, противораковой терапией, например, облучением. Такие терапевтические агенты включают, среди прочего, противоопухолевые агенты, такие как доксорубин (адриамицин), цисплатин, блеомицин сульфат, кармустин, хлорамбуцил, декарбазин и циклофосфамидгидроксимочевина, которые, сами по себе, являются эффективными только при уровнях, которые являются токсичными или субтоксичными для пациента. Цисплатин вводят внутривенно в количестве 100 мг на дозу один раз каждые четыре недели, и адриамицин вводят внутривенно в виде дозы 60-75 мг/мл один раз каждые 21 день. Совместное введение макроциклических пептидов по настоящему изобретению с химиотерапевтическими агентами обеспечивает два противораковых агента, которые действуют посредством различных механизмов, которые оказывают цитотоксическое действие в отношении опухолевых клеток человека. Такое совместное введение может решить проблемы, связанные с развитием устойчивости к лекарственным средствам или изменением антигенности опухолевых клеток, которые будут делать их неактивными с данными пептидами.

В объем настоящего изобретения входят также наборы, содержащие композиции по настоящему изобретению (например, макроциклических пептидов, биспецифических или полиспецифических молекул или иммуноконъюгатов) и инструкции для применения. Кроме того, такой набор может содержать по меньшей мере один дополнительный реагент или один или несколько дополнительных макроцикли-

ческих пептидов по настоящему изобретению (например, антитело человека, имеющее дополняющую активность, которое связывается с эпитопом в антигене PD-1, не совпадающим с макроциклом). Наборы обычно содержат этикетку, указывающую предполагаемое применение содержимого данного набора. Термин "этикетка" включает любое описание или записанный материал, поставляемый на или с набором, или материал, который иным образом прилагается к набору.

Комбинированная терапия.

Комбинация макроциклических пептидов по настоящему изобретению с другим PD-L1 антагонистом и/или другим иммуномодулятором полезна для усиления иммунной реакции против гиперпролиферативного заболевания. Например, такие молекулы могут быть введены в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или субъектам-людям, например, *in vivo*, для усиления иммунитета в различных ситуациях. Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ модификации иммунной реакции у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту макроциклического пептида по настоящему изобретению таким образом, что иммунная реакция у данного субъекта модифицируется. Предпочтительно, данная реакция усиливается, стимулируется или положительно регулируется. В другом варианте осуществления данное изобретение относится к способу изменения неблагоприятных событий (побочных эффектов), связанных с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим терапевтическим агентом, предусматривающему введение макроциклического пептида по настоящему изобретению и субтерапевтической дозы другого иммуномодулятора субъекту.

Блокада PD-L1 макроциклическими пептидами может усиливать иммунную реакцию на раковые клетки у пациента. Типы рака, рост которых может быть ингибирован применением макроциклических пептидов по настоящему изобретению, включают типы рака, обычно отвечающие на иммунотерапию. Репрезентативные примеры рака для лечения комбинированной терапией по настоящему изобретению включают меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), рак почки, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак ободочной кишки и рак легкого. Примеры других типов рака, которые могут подвергаться лечению с использованием способов по настоящему изобретению, включают костный рак, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы и шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, рак яичника, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, рак яичек, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному вагины, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, не-Ходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паразитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягкой ткани, рак мочепускающего канала, рак пениса, хронические или острые лейкозы, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечных лоханок, неоплазму центральной нервной системы (ЦНС), лимфому первичной ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль спинного мозга, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, индуцированные условиями окружающей среды раковые заболевания, включая раковые заболевания, индуцированные асбестом, и комбинации указанных типов рака. Настоящее изобретение полезно также для лечения метастазирующих типов рака.

В некоторых вариантах осуществления комбинация терапевтических агентов, содержащая по меньшей мере один макроциклический пептид, обсуждаемый в данном описании, может вводиться одновременно в виде единой композиции в фармацевтически приемлемом носителе или одновременно в виде отдельных композиций, где каждый агент может вводиться последовательно. Например, второй иммуномодулятор и макроциклический пептид по настоящему изобретению могут быть введены последовательно, таким образом, что указанный второй иммуномодулятор вводят первым, и указанный второй макроциклический пептид вторым, или сначала вводят макроциклический пептид и вторым - второй иммуномодулятор. Кроме того, если вводят последовательно более чем одну дозу комбинированной терапии, порядок последовательного введения может быть обратным или может сохраняться один и тот же порядок введения в каждой временной точке введения, последовательные введения могут комбинироваться с совместными введениями или любой их комбинацией. Например, первое введение второго иммуномодулятора и макроциклического пептида может быть совместным, второе введение может быть последовательным со вторым иммуномодулятором первым и макроциклическим пептидом вторым, и третье введение может быть последовательным с макроциклическим пептидом первым и вторым иммуномодулятором вторым, и т.д. Другая репрезентативная схема введения доз может включать первое введение, которое является последовательным с макроциклическим пептидом первым и вторым иммуномодулятором вторым, и последующие введения могут быть одновременными.

Необязательно, комбинация макроциклического пептида и второго иммуномодулятора может дополнительно комбинироваться с иммуногенным агентом, таким как раковые клетки, очищенные опухолевые антигены (включая рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al., *J. Immunol.*, 173:4919-4928 (2004)). Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин, которые могут быть использованы, включают пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-

2, MART1 и/или тирозиназу, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (обсуждаемые дополнительно ниже).

Объединенные PD-L1 макроциклический пептид и второй иммуномодулятор могут быть дополнительно скомбинированы с протоколом вакцинации. Было разработано множество экспериментальных стратегий вакцинации против опухолей (см. 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); см. также Restifo et al., *Cancer Vaccines*, Chapter 61, pp. 3023-3043 в DeVita et al., eds., *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Fifth Edition (1997)). В одной из таких стратегий вакцину готовят с использованием аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что клеточные вакцины являются наиболее эффективными при трансдукции опухолевых клеток для экспрессии GM-CSF. Было показано, что GM-CSF является сильным активатором презентации антигена для противоопухолевой вакцинации (Dranoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3539-3543 (1993)).

Исследование экспрессии генов и ширококомасштабных распределений экспрессии в различных опухолях привело к определению так называемых опухолеспецифических антигенов (Rosenberg, *Immunity*, 10:281-287 (1999)). Во многих случаях, эти опухолеспецифические антигены являются антигенами дифференцировки, экспрессируемыми в опухолях и в клетке, из которой возникла данная опухоль, например, антигенами меланоцитов gp100, антигенами MAGE и Trp-2. Более важно, было показано, что многие из указанных антигенов являются мишенями опухолеспецифических Т-клеток, обнаруженных у данного хозяина. В некоторых вариантах осуществления комбинированные PD-L1 макроциклический пептид и второй иммуномодулятор могут быть использованы в сочетании с набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессируемых в опухоли, для генерирования иммунной реакции на указанные белки. Эти белки в норме рассматриваются иммунной системой как аутоантигены и, следовательно, являются толерантными к ним. Опухолевый антиген может также включать белок теломеразу, который необходим для синтеза теломеров хромосом и который экспрессируется в более чем 85% типов рака человека и только в ограниченном числе соматических тканей (Kim et al., *Science*, 266:2011-2013 (1994)). (Эти соматические ткани могут быть защищены от иммунной атаки различными способами). Опухолевым антигеном могут быть также "неоантигены", экспрессируемые в раковых клетках вследствие соматических мутаций, которые изменяют последовательность белка или создают слитые белки между двумя неродственными последовательностями (т.е. bcr-abl в хромосоме Philadelphia) или идиотип из В-клеточных опухолей.

Другие противоопухолевые вакцины могут включать белки из вирусов, участвующие в раковых заболеваниях человека, таких как папилломавирусы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус саркомы Капоши (KHSV). Другой формой опухолеспецифического антигена, который может быть использован в сочетании с блокадой PD-L1 макроциклическим пептидом, является белки теплового шока (HSP), выделенные из самой ткани опухоли. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, и такие HSP являются высокоэффективными в доставке антигенпрезентирующих клеток для индукции противоопухолевого иммунитета (Suot et al., *Science*, 269:1585-1588 (1995); Tamura et al., *Science*, 278:117-120 (1997)).

Дендритные клетки (DC) являются сильными антигенпрезентирующими клетками, которые могут быть использованы для прайминга антигенспецифических реакций. DC могут продуцироваться *ex vivo* и загружаться различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle et al., *Nat. Med.*, 4:328-332 (1998)). DC могут также переноситься генетическими средствами для экспрессии опухолевых антигенов. DC были также слиты непосредственно с опухолевыми клетками в целях иммунизации (Kugler et al., *Nat. Med.*, 6:332-336 (2000)). В качестве способа вакцинации, иммунизация DC может быть дополнительно эффективно объединена с объединенными анти-PD-L1 макроциклическим пептидом и вторым иммуномодулятором для активации более сильных противоопухолевых реакций.

Объединенные анти-PD-L1 макроциклический пептид и дополнительный иммуномодулятор могут также дополнительно комбинироваться со стандартными противораковыми терапиями. Например, комбинация макроциклического пептида и второго иммуномодулятора может эффективно комбинироваться с химиотерапевтическими схемами лечения. В этих случаях, как наблюдали с комбинацией макроциклического пептида и второго иммуномодулятора, может быть возможным уменьшить дозу другого химиотерапевтического реагента, вводимого с комбинацией по настоящему изобретению (Mokyr et al., *Cancer Res.*, 58:5301-5304 (1998)). Примером такой комбинации является комбинация макроциклического пептида и второго иммуномодулятора, дополнительно в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другим примером является комбинация макроциклического пептида и второго иммуномодуляторного агента, дополнительно в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научным обоснованием, лежащим в основе совместного применения анти-PD-L1 макроциклического пептида и другого иммуномодулятора с химиотерапией является то, что гибель клеток, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить к повышенным уровням опухолевого антигена в пути презентации антигена. Другие виды комбинированных тера-

пий, которые могут приводить к синергизму с объединенными анти-PD-L1 макроциклическим пептидом и дополнительным иммуномодулятором посредством гибели клеток, включают облучение, хирургию и выключение эндокринной функции. Каждый из указанных протоколов создает источник опухолевого антигена у хозяина. Ингибиторы ангиогенеза также могут комбинироваться с объединенными анти-PD-L1 макроциклическим пептидом и вторым иммуномодулятором. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, которые также могут быть источником опухолевого антигена, который должен быть подан в пути презентации антигенов хозяина.

Комбинация PD-L1 и другого иммуномодулятора также может быть использована в комбинации с биспецифическими макроциклическими пептидами, которые нацеливают экспрессирующие рецептор Fc $\alpha$  или Fc $\gamma$  эффекторные клетки на опухолевые клетки (см., например, патенты США № 5922845 и 5837243). Биспецифические макроциклические пептиды могут быть использованы для нацеливания на два отдельных антигена. Например, биспецифические макроциклические пептиды против рецептора Fc/против опухолевого антигена (например, Her-2/neu) использовали для нацеливания макрофагов на участки опухоли. Такое нацеливание может более эффективно активировать опухолеспецифические реакции. Т-клеточная ветвь указанных реакций может увеличиваться с использованием объединенных PD-L1 и второго иммуномодулятора. В качестве альтернативы, антиген может доставляться непосредственно к DC с использованием биспецифических макроциклических пептидов, которые связываются с опухолевым антигеном и специфическим в отношении дендритных клеток маркером поверхности 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® (тозитумаб), ZEVALIN® (ибритумаб), CAMPATH® (алемтузумаб), LYMPHOCIDE® (эпртузумаб), AVASTIN® (бевацизумаб) и TARCEVA® (эрлотиниб), и тому подобное. В качестве примера и без связи с теорией, лечение противораковым антителом или противораковым антителом, конъюгированным с токсином, может приводить к гибели раковых клеток (например, опухолевых клеток), которые могут потенцировать иммунную реакцию, опосредованную второй иммуномодулирующей мишенью или PD-L1. В примере варианта осуществления лечение гиперпролиферативного заболевания (например, раковой опухоли) может включать противораковое антитело в комбинации с макроциклическим пептидом и вторым иммуномодулятором, одновременно или последовательно, или любой их комбинации, которые могут потенцировать противоопухолевые иммунные реакции хозяина.

Опухоли уклоняются от иммунологического надзора хозяина с помощью большого разнообразия механизмов. Многие из таких механизмов могут быть преодолены инактивацией белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммуносупрессивными. Они включают, среди прочего, 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 каждому из указанных агентов могут быть дополнительно объединены с макроциклическим пептидом и другим иммуномодулятором для противодействия влиянию иммуносупрессивных агентов и содействия иммунным реакциям хозяина против опухоли. Другие агенты, которые могут быть использованы для активации иммунологической ответственности хозяина, могут быть дополнительно использованы в комбинации с макроциклическим пептидом по настоящему изобретению. Они включают в себя молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентацию антигена. Анти-CD40 макроциклические пептиды способны эффективно заменять активность Т-клеток-хелперов (Ridge, J. et al., Nature, 393:474-478 (1998)) и могут быть использованы совместно с макроциклическими пептидами по настоящему изобретению, либо отдельно, либо в комбинации с комбинацией 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 обеспечивать увеличенные уровни активации Т-клеток.

Трансплантацию костного мозга используют в настоящее время для лечения различных опухолей гемопоэтического происхождения. Хотя реакция трансплантат против хозяина является следствием такой терапии, можно получить терапевтическую пользу из реакций трансплантат против хозяина. Макроциклический пептид по настоящему изобретению, либо отдельно, либо в комбинации с другим иммуномодулятором, может быть использован для повышения эффективности пересаженных опухолеспецифических Т-клеток донора. Имеются также несколько экспериментальных протоколов терапии, которые включают активацию *ex vivo* и размножение антигенспецифических Т-клеток и адоптивный (со стойким приживлением) перенос указанных клеток реципиентам для получения антигенспецифических Т-клеток против опухоли (Greenberg, R. et al., Science, 285:546-551 (1999)). Такие способы также могут быть использованы для активации Т-клеточных реакций на инфекционные агенты, такие как CMV. Можно ожидать, что активация *ex vivo* в присутствии макроциклического пептида по настоящему изобретению, либо отдельно, либо в комбинации с другим иммуномодулятором, будет увеличивать встречаемость и активность адоптивно перенесенных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу изменения по-

бочных эффектов, связанных с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим агентом, предусматривающий введение макроциклического пептида по настоящему изобретению в комбинации с субтерапевтической дозой другого иммуномодулятора субъекту. Например, такие способы по настоящему изобретению обеспечивают способы уменьшения встречаемости индуцированных иммуностимулирующим терапевтическим антителом колита или диареи введением неабсорбируемого стероида пациенту. Поскольку любой пациент, который будет получать иммуностимулирующее терапевтическое антитело, имеет риск развития колита или диареи, индуцированных таким лечением, вся популяция пациентов в целом подходит для терапии в соответствии со способами по настоящему изобретению. Хотя стероиды вводили для лечения воспалительного заболевания пищеварительного тракта (IBD) и предотвращения обострений IBD, их не использовали для предотвращения (уменьшения встречаемости) IBD у пациентов, которые не имели диагноза IBD. Существенные побочные действия, связанные со стероидами, даже неабсорбируемыми стероидами, препятствовали их профилактическому использованию.

В других вариантах осуществления макроциклический пептид по настоящему изобретению либо отдельно, либо в комбинации с другим иммуномодулятором может быть дополнительно комбинирован с применением любого неабсорбируемого стероида. В контексте данного документа, "неабсорбируемый стероид" представляет собой глюкокортикоид, который проявляет экстенсивный метаболизм первого прохождения таким образом, что после метаболизма в печени биодоступность стероида является низкой, т.е. меньше чем около 20%. В одном варианте осуществления настоящего изобретения неабсорбируемый стероид представляет собой будесонид. Будесонид является локально действующим глюкокортикостероидом, который экстенсивно метаболизируется, прежде всего, печенью после перорального введения. ENTOCORT® EC (Astra-Zeneca) является зависимой от pH и времени пероральной формой будесонида, разработанной для оптимизации доставки лекарственного средства в подвздошную кишку и через ободочную кишку. ENTOCORT® EC одобрен в США для лечения легкой-умеренной степени выраженности болезни Крона, включающей подвздошную и/или восходящую ободочную кишку. Обычная пероральная доза ENTOCORT® EC для лечения болезни Крона составляет 6-9 мг/день. ENTOCORT® EC высвобождается в кишечнике перед абсорбцией и сохраняется в слизистой оболочке кишечника. После прохождения его через ткань слизистой оболочки кишечника, ENTOCORT® EC экстенсивно метаболизируется системой цитохрома P450 в печени до метаболитов с незначительной глюкокортикоидной активностью. Таким образом, биодоступность является низкой (около 10%). Такая низкая биодоступность будесонида приводит к улучшенному терапевтическому индексу в сравнении с другими глюкокортикоидами с менее экстенсивным метаболизмом первого прохождения. Будесонид приводит к меньшим побочным эффектам, включая меньшую гипоталамическую-гипофизарную супрессию, чем у системно действующих кортикостероидов. Однако продолжительное введение ENTOCORT® EC может привести к системным проявлениям действия глюкокортикоидов, таким как гиперкортицизм и супрессия надпочечников. См. Physicians' Desk Reference Supplement, 58th Edition, 608-610 (2004).

В еще других вариантах осуществления комбинация PD-L1 и другого иммуномодулятора в сочетании с неабсорбируемым стероидом может быть дополнительно объединена с салицилатом. Салицилаты включают агенты 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).

Дозирование и лекарственная форма.

Предусмотренный изобретением пептид формулы I или, более конкретно, макроциклический пептид, описанный здесь, может быть введен пациентам для лечения диабета и других связанных с ним заболеваний в виде соединения в монотерапии и/или смешанного с приемлемым носителем в форме фармацевтических композиций. Специалисты в области лечения диабета могут легко определить дозировку и путь введения соединения млекопитающим, включая людей, нуждающимся в таком лечении. Путь введения может включать, но не ограничивается ими, пероральный, интраоральный, ректальный, трансдермальный, буккальный, интраназальный, ингаляционный, подкожный, внутримышечный, интрадермальный, подязычный, внутрикишечный, интраокулярный, внутривенный или интестинальный прием. Рецептура соединения составлена в соответствии с путем введения на основе приемлемой фармакологической практики (Fingl et al., в *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Chapter 1, p. 1 (1975); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Фармацевтически приемлемые композиции пептидов, описанные здесь, могут быть введены в виде нескольких лекарственных форм, таких как таблетки, капсулы (каждая из которых включает композиции с замедленным или контролируемым по времени высвобождением), пилюли, порошки, гранулы, эликсиры, гели *in situ*, микро-сферы, кристаллические комплексы, липосомы, микроэмульсии, настойки, суспензии, сиропы, аэрозольные спреи и эмульсии. Композиции, описанные в настоящем документе, могут также вводиться в пероральной, внутривенной (болюсное или инфузионное введение), внутривенной, подкожной, трансдермальной или внутримышечной форме, все с использованием лекарственных форм, хорошо известных специалистам в области фармакологии. Такие композиции могут быть введены отдельно, но обычно их вводят с фармацевтическим носителем, выбранным на основе выбранного способа введения и стан-

дартной фармацевтической практики.

Режим дозирования композиций, описанных здесь, будет, разумеется, варьироваться в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические характеристики конкретного агента и способа и пути его введения; вид, возраст, пол, состояние здоровья, медицинское показание и вес реципиента; характер и степень симптомов; вид сопутствующего лечения; частота лечения; путь введения, функция почек и печени пациента и желаемый результат. Врач или ветеринар может определить и назначить эффективное количество лекарственного средства, необходимое для предотвращения, противодействия или остановки прогрессирования болезненного состояния. В соответствии с общим руководством ежедневная пероральная доза активного ингредиента при использовании для указанных воздействий будет составлять от около 0,001 до 1000 мг/кг массы тела, предпочтительно от около 0,01 до 100 мг/кг массы тела в день и наиболее предпочтительно от около 0,6 до 20 мг/кг/день. Внутривенно суточная доза активного ингредиента при использовании для указанных воздействий будет варьироваться от 0,001 до 100,0 нг/мин на 1 кг массы тела во время инфузии с постоянной скоростью. Такая постоянная внутривенная инфузия может предпочтительно проводиться со скоростью от 0,01 нг до 50 нг/мин на 1 кг массы тела и наиболее предпочтительно от 0,01 нг до 10,0 мг/мин на 1 кг массы тела. Композиции, описанные здесь, могут вводиться в виде однократной суточной дозы, или общая суточная доза может вводиться в виде разделенных доз два, три или четыре раза в день. Композиции, описанные в настоящем документе, могут также вводиться с помощью депо-композиции, которая позволит обеспечить длительное высвобождение лекарственного средства в течение нескольких дней/недель/месяцев по желанию.

Композиции, описанные здесь, можно вводить в интраназальной форме посредством местного применения подходящих интраназальных средств доставки или трансдермальными путями с использованием трансдермальных пластырей для кожи. При введении в виде трансдермальной системы доставки введение лекарственного средства, конечно, будет непрерывным, а не прерывистым на протяжении всего режима дозирования. Композиции обычно вводят в смеси с подходящими фармацевтическими разбавителями, вспомогательными веществами или носителями (в совокупности называемыми здесь как фармацевтические носители), подходящим образом выбранными в отношении предполагаемой формы введения, т.е. пероральных таблеток, капсул, эликсиров, аэрозольных спреев, полученных с или без пропеллента, и сиропов, и в соответствии с известными фармацевтическими практиками.

Например, для перорального введения в форме таблетки или капсулы активный лекарственный компонент может быть объединен с оральным, нетоксичным, фармацевтически приемлемым инертным носителем, таким как, но не ограничиваясь этим, лактоза, крахмал, сахароза, глюкоза, метилцеллюлоза, стеарат магния, дикальцийфосфат, сульфат кальция, маннит и сорбит; для перорального введения в жидкой форме пероральные лекарственные компоненты могут быть объединены с любым пероральным, нетоксичным, фармацевтически приемлемым инертным носителем, таким как, но не ограничиваясь этим, этанол, глицерин и вода. Кроме того, когда желательно или необходимо, в смесь также могут быть включены подходящие связывающие, смазывающие вещества, дезинтегрирующие агенты и красители. Подходящие связывающие вещества включают, но не ограничиваясь ими, крахмал, желатин, природные сахара, такие как, но не ограничиваясь ими, глюкоза или бета-лактоза, кукурузные подсластители, природные и синтетические смолы, такие как аравийская камедь, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлоза, полиэтиленгликоль и воски. Смазывающие вещества, используемые в этих лекарственных формах, включают олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия и хлорид натрия. Дезинтегрирующие агенты включают, но не ограничиваются ими, крахмал, метилцеллюлозу, агар, бентонит и ксантановую смолу.

Композиции, описанные в настоящем документе, могут также вводиться в виде смешанных мицеллярных или липосомных систем доставки, таких как малые моноламеллярные везикулы, большие моноламеллярные везикулы и многослойные везикулы. Липосомы могут быть образованы из множества фосфолипидов, таких как холестерин, стеариламин или фосфатидилхолины. Усилители проницаемости могут быть добавлены для усиления абсорбции лекарственного средства.

Поскольку известно, что пролекарства усиливают многочисленные желаемые качества фармацевтических препаратов (т.е. растворимость, биодоступность, перерабатываемость и т.д.), описанные в настоящем документе соединения могут быть доставлены в пролекарственной форме. Таким образом, объект изобретения, описанный здесь, предназначен для охвата пролекарств заявленных соединений, способов их доставки и содержащих их композиций.

Описанные здесь композиции также могут быть объединены с растворимыми полимерами в качестве целевых носителей лекарственных средств. Такие полимеры могут включать поливинилпирролидон, сополимер пирана, полигидроксипропилметакриламидфенол, полигидроксиэтиласпартамидфенол или полиэтиленоксид-полилизин, замещенный пальмитоильными остатками. Кроме того, описанные здесь композиции могут быть объединены с классом биоразлагаемых полимеров, пригодных для достижения контролируемого высвобождения лекарственного средства, например, полимолочной кислотой, полигликолевой кислотой, сополимерами полимолочной и полигликолевой кислот, поли-(эпилюнок-капролактон), полигидроксимасляной кислотой, полиортоэфирными, полиацетальными, полидигидропиранами, полицианоацилатами и сшитыми или амфипатическими блок-сополимерами гидрогелей.

Лекарственные формы (фармацевтические композиции), подходящие для введения, могут содержать от около 0,01 до около 500 мг активного ингредиента на единицу дозы. В этих фармацевтических композициях активный ингредиент обычно будет присутствовать в количестве около 0,5-95 мас.% в расчете на общую массу композиции.

Желатиновые капсулы могут содержать активный ингредиент и порошкообразные носители, такие как лактоза, крахмал, производное целлюлозы, стеарат магния и стеариновая кислота. Аналогичные разбавители можно использовать для изготовления прессованных таблеток. Как таблетки, так и капсулы могут быть изготовлены в виде продуктов с замедленным высвобождением для обеспечения непрерывного высвобождения лекарственного средства в течение нескольких часов. Прессованные таблетки могут быть покрыты сахаром или пленкой, чтобы заглушить любой неприятный вкус и защитить таблетку от атмосферного воздействия, или желудочно-резистентной оболочкой для селективного распада в желудочно-кишечном тракте.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения могут содержать краситель и ароматизатор, чтобы увеличить приемлемость пациентами.

В общем, подходящими носителями для парентеральных растворов являются вода, подходящее масло, физиологический раствор, водный раствор декстрозы (глюкозы) и соответствующие сахарные растворы и гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоли. Раствор для парентерального введения предпочтительно содержит водорастворимую соль активного ингредиента, подходящие стабилизирующие агенты и, при необходимости, буферные вещества. Подходящими стабилизирующими агентами являются антиокислительные агенты, такие как бисульфит натрия, сульфит натрия или аскорбиновая кислота. Также используются лимонная кислота и ее соли и эдетат натрия. 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 справочнике в данной области.

Типичные применяемые фармацевтические лекарственные формы для введения описанных здесь соединений могут быть проиллюстрированы следующим образом.

#### Капсулы.

Большое количество единичных капсул может быть получено путем заполнения стандартных двухкомпонентных твердых желатиновых капсул 100 мг порошкообразного активного ингредиента, 150 мг лактозы, 50 мг целлюлозы и 6 мг стеарата магния.

#### Мягкие желатиновые капсулы.

Смесь активного ингредиента в усваиваемом масле, таком как соевое, хлопковое или оливковое, может быть приготовлена и введена с помощью поршневого насоса прямого вытеснения в желатин с образованием мягких желатиновых капсул, содержащих 100 мг активного ингредиента. Капсулы следует мыть и сушить.

#### Таблетки.

Таблетки могут быть приготовлены обычными способами таким образом, что дозированная единица, например, составляет 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 применяться соответствующие покрытия оболочкой для повышения вкусовых качеств или задержки абсорбции.

#### Инъекционные препараты.

Инъекцируемая рецептура пептидной композиции, описанной здесь, может или не может потребовать использования вспомогательных веществ, которые были одобрены контролирующими структурами. Эти вспомогательные вещества включают, но не ограничиваются ими, растворители и соразтворители, солюбилизаторы, эмульгирующие или загущающие агенты, хелатирующие агенты, антиоксиданты и восстановители, антимикробные консерванты, буферы и регуляторы pH, наполнители, защитные вещества и регуляторы тоничности и специальные добавки. Инъекцируемая композиция должна быть стерильной, без пирогена и, в случае растворов, без твердых частиц.

Парентеральную композицию, подходящую для введения путем инъекции, можно получить путем перемешивания, например, 1,5 мас.% активного ингредиента в фармацевтически приемлемом буфере, который может содержать или не содержит соразтворитель или другое вспомогательное вещество. Такой раствор должен быть изготовлен изотоническим с хлоридом натрия и стерилизован.

#### Суспензия.

Водная суспензия может быть приготовлена для перорального и/или парентерального введения таким образом, что, например, каждые 5 мл содержат 100 мг тонкоизмельченного активного ингредиента, 20 мг натрия карбоксиметилцеллюлозы, 5 мг бензоата натрия, 1,0 г раствора сорбита, U.S.P., 0,025 мл ванилина или других вкусовых ароматизаторов.

#### Биоразлагаемые микрочастицы.

Парентеральная композиция с замедленным высвобождением, подходящая для введения путем инъекции, может быть получена, например, путем растворения подходящего биоразлагаемого полимера

в растворителе, добавления в этот раствор полимера активного агента, который должен быть включен, и удаления растворителя из матрицы, тем самым образуя матрицу полимера с активным агентом, распределенным по всей матрице.

Синтез пептидов.

Описание настоящего изобретения в настоящем документе должно толковаться в соответствии с законами и принципами химической связи. Следует понимать, что соединения, охватываемые настоящим изобретением, являются подходящими для использования в качестве фармацевтического агента. Специалист в данной области будет знать, какие соединения будут и не будут стабильными на основе общих принципов химической связи и стабильности.

Химический синтез макроциклического пептида по настоящему изобретению может быть осуществлен с использованием различных принятых в данной области способов, включая ступенчатый твердофазный синтез, полусинтез через конформационно-вспомогательное повторное лигирование пептидных фрагментов, ферментативное лигирование клонированных или синтезированных пептидных сегментов и химическое лигирование. Предпочтительным способом синтеза описанных здесь макроциклических пептидов и их аналогов является химический синтез с использованием различных твердофазных методик, таких как описанные в Chan, W.C. et al., eds., *Fmoc Solid Phase Synthesis*, Oxford University Press, Oxford (2000); Barany, G. et al., *The 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 применении группы Fmoc (9-флуоренилметилметилоксикарбонил) для временной защиты  $\alpha$ -аминогруппы в комбинации с трет-бутил группой для временной защиты боковых цепей аминокислот (см., например, Atherton, E. et al., "The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group", в *The 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 постадийно на нерастворимой полимерной подложке (также называемой "смола"), начиная с С-конца пептида. Синтез начинают путем прикрепления С-концевой аминокислоты пептида к смоле путем образования амидной или сложноэфирной связи. Это способствует последующему выделению полученного в результате пептида в виде С-концевого амида или карбоновой кислоты соответственно. Требуется, чтобы С-концевая аминокислота и все другие аминокислоты, используемые в синтезе, имели свои  $\alpha$ -аминогруппы и функциональные группы боковой цепи (если они присутствуют), дифференциально защищенные таким образом, что защищающая  $\alpha$ -аминогруппа может быть селективно удалена в ходе синтеза. Связывание аминокислоты осуществляют путем активации ее карбоксильной группы в качестве активного сложного эфира и ее реакции с неблокированной  $\alpha$ -аминогруппой N-концевой аминокислоты, присоединенной к смоле. Последовательность удаления и связывания  $\alpha$ -аминогруппы повторяется до тех пор, пока не будет собрана целая пептидная последовательность. Затем пептид высвобождается из смолы с одновременным снятием защитных групп боковых цепей, обычно в присутствии подходящих поглотителей для ограничения побочных реакций. Полученный пептид окончательно очищают с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой.

В синтезе пептидил-смог, необходимых в качестве предшественников конечных пептидов, используются коммерчески доступные шитые полистирольные полимерные смолы (Novabiochem, San Diego, CA, Applied Biosystems, Foster City, CA). Предпочтительными твердыми носителями являются: 4-(2',4'-диметоксифенил)-Fmoc-аминометилфеноксиацетил-*p*-метилбензгидриламиновая смола (амидная смола Ринка МВНА); 9-Fmoc-амино-ксантен-3-илокси смола Меррифилда (амидная смола Зибера); 4-(9-Fmoc)аминометил-3,5-диметоксифеноксидвалерил-аминометиловая смола Меррифилда (смола PAL) для С-концевых карбоксамидов. Связывание первой и последующих аминокислот может быть осуществлено с использованием активных сложных эфиров HOBt, 6-Cl-HOBt или HOAt, полученных из DIC/HOBt, HBTU/HOBt, BOP, PyBOP или из DIC/6-Cl-HOBt, HCTU, DIC/HOAt или NATU соответственно. Предпочтительными твердыми носителями являются: 2-хлортритилхлоридная смола и смола 9-Fmoc-амино-ксантен-3-илокси-смола Меррифилда (амидная смола Зибера) для защищенных пептидных фрагментов. Загрузка первой аминокислоты на 2-хлортритилхлоридную смолу лучше всего достигается путем взаимодействия Fmoc-защищенной аминокислоты со смолой в дихлорметане и DIEA. Если необходимо, небольшое количество DMF может быть добавлено для облегчения растворения аминокислоты.

Синтез описанных здесь пептидных аналогов может быть осуществлен с использованием одно- или многоканального пептидного синтезатора, такого как СВЧ-синтезатор CEM Liberty, или синтезатора Prelude (6 каналов) или синтезатора Symphony (12 каналов), Protein Technologies, Inc.

Предшественники пептидил-смог для их соответствующих пептидов могут быть отщеплены со снятием с них защиты с помощью любого стандартного способа (см., например, King, D.S. et al., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 36:255-266 (1990)). Предпочтительным способом является использование TFA в присутствии воды и TIS в качестве поглотителей. Как правило, пептидил-смолу перемешивают в TFA/вода/TIS (94:3:3, об.:об.:об., 1 мл/100 мг пептидил-смолы) в течение 2-6 ч при комнатной температуре. Отработанную смолу затем отфильтровывают, и раствор TFA концентрируют или сушат при пониженном давлении. Полученный неочищенный пептид либо осаждают и промывают  $\text{Et}_2\text{O}$ , или повторно растворяют

непосредственно в DMSO или 50% водной уксусной кислоте для очистки с помощью препаративной ВЭЖХ.

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

Экспериментальная часть.

Сокращения, используемые в настоящей заявке, в том числе, в частности, в иллюстративных схемах и примерах, которые следуют ниже, хорошо известны специалистам в данной области техники. Некоторые из используемых сокращений выглядят следующим образом: DMF для N,N-диметилформамида; HATU для O-(7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионий гексафторфосфата; HCTU для O-(6-Cl-1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионий гексафторфосфата; TFA для трифторуксусной кислоты; DBU для 1,8-диазобисцикло[5.4.0]ундек-7-ена; DIAD для диизопропил азодикарбоксилата; TIS для триизопропилсилана; DMSO для диметилсульфоксида; MeCN или ACN для ацетонитрила; DCM для 1,1-дихлорметана;

DI EA или DIPEA для диизопропилэтиламина; Fmoc для 9-флуоренилметилоксикарбонила; NMM для N-метилморфолина; DMAP для 4-N,N-диметиламинопиридина; NMP для N-метилпирролидона; Ac для ацетила и Et для этила.

Аналитические данные.

Масс-спектрометрия: "ESI-MS(+)" означает масс-спектрометрию с электрораспылительной ионизацией, выполненную в режиме регистрации положительных ионов; "ESI-MS(-)" означает масс-спектрометрию с электрораспылительной ионизацией, выполненную в режиме регистрации отрицательных ионов; "ESI-HRMS(+)" означает жидкостную хроматомасс-спектрометрию с электрораспылительной ионизацией, выполненную в режиме регистрации положительных ионов; "ESI-HRMS(-)" означает жидкостную хроматомасс-спектрометрию с электрораспылительной ионизацией, выполненную в режиме регистрации отрицательных ионов. Установленные значения массы приводятся после обозначения единицы измерения "m/z". Соединения с точными массами более 1000 часто детектировались в виде двухзарядных или трехзарядных ионов.

ЖХ-МС анализ, условие А:

колонка: Waters VEN C18, 2,1×50 мм, 1,7 мкм; подвижная фаза А: вода с 0,05% TFA; подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,05% TFA; температура: 50°C; градиент: от 2% В до 98% В на протяжении 2 мин, затем 0,5 мин удерживание при 98% В; скорость потока: 0,8 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм.

ЖХ-МС анализ, условие С:

колонка: Waters VEN C18, 2,1×50 мм, 1,7 мкм; подвижная фаза А: вода с 0,2% муравьиной кислоты и 0,01% TFA; подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,2% муравьиной кислоты и 0,01% TFA; температура: 50°C; градиент: от 2% В до 80% В на протяжении 2 мин, от 80% В до 98% В на протяжении 0,1 мин, затем 0,5 мин удерживание при 98% В; скорость потока: 0,8 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм.

ЖХ-МС анализ, условие D:

колонка: Waters VEN C18, 2,1×50 мм, 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; температура: 70°C; градиент: 0-100% В на протяжении 3 мин, затем 2,0-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 0,75 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм.

ЖХ-МС анализ, условие E:

колонка: Waters VEN C18, 2,1×50 мм, 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; температура: 50°C или 70°C; градиент: 0-100% В на протяжении 3 мин, затем 0,75 или 2,0-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 0,75 или 1,11 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм.

ЖХ-МС анализ, условие F:

колонка: Waters XBridge C18, 2,1×50 мм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; температура: 35°C; градиент: 0-100% В на протяжении 4 мин, затем 1-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 4 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм.

ЖХ-МС анализ, условие G:

колонка: Waters VEN C18, 2,0×50 мм, 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; температура: 50°C; градиент: 0-100% В на протяжении 3 мин, затем 0,5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 0,5 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм.

ЖХ-МС анализ, условие H:

колонка: Waters VEN C18, 2,0×50 мм, 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммо-

ния; температура: 50°C; градиент: 0-100% В на протяжении 3 мин, затем 0,5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 1,0 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм.

ЖХ-МС анализ, условие I:

колонка: Waters ВЕН С18, 2,0×50 мм, 1,7 мкм; подвижная фаза АА: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; температура: 50°C; градиент: 0-100% В на протяжении 3 мин, затем 0,5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 0,5 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм.

ЖХ-МС анализ, условие J:

колонка: Waters СSH С18, 2,1×50 мм, 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с трифторуксусной кислотой; температура: 70°C; градиент: 0% В, 0-100% В на протяжении 3 мин, затем 2,0-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 0,75 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм.

Общие методики.

Способ А "Symphony".

Все манипуляции выполнялись автоматически на синтезаторе пептидов Symphony (Protein Technologies). Все методики, если не указано иное, выполнялись в полипропиленовом сосуде Symphony, оснащенном нижней фриттой (пористый стеклянный фильтр). Сосуд соединяется с синтезатором пептидов Symphony через как нижнюю, так и верхнюю часть пробирки. Все растворители, DMF, DCM, аминокислоты и реагенты добавляли через дно сосуда и пропускали через фритту для контакта с смолой. Все растворы удаляются через дно сосуда. "Периодическое перемешивание" описывает короткий импульс газообразного N<sub>2</sub> через нижнюю фритту; импульс длится примерно 5 с и происходит каждые 15 с. Растворы аминокислот обычно не использовались более трех недель после приготовления. Раствор HATU использовали в течение 5 дней после приготовления. DMF=диметилформамид; DCM=дихлорметан; THF=тетрагидрофуран; HCTU=2-(6-хлор-1-Н-бензотиазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионий; HATU=1-[бис(диметиламино)метилен]-1Н-1,2,3-триазол[4,5-б]пиридиний 3-оксидгексафторфосфат; NMM=п-метилморфолин; DIPEA=диизопропилэтиламин; DMAP=N,N-диметилпиридин-4-амин; смола Ринка=4-(2',4'-диметоксифенил-Фмос-аминометил)феноксиацетида-аминометильная смола; смола Зибер=Фмос-аминоксантен-3-илокси, где "3-илокси" описывает положение и тип соединения с полистирольной смолой. Используемые смолы представляют собой полимер Меррифилда (полистирол) либо с линкером Ринка, либо Зибер (Фмос-защищенный на азоте); 100-200 меш, 1% DVB, 0,35 или 0,71 ммоль/г соответственно. Другие типичные кислотнo-чувствительные смолы, такие как функционализированная хлортритильная смола, также могут быть использованы в синтезе. Используемые типичные аминокислоты с защитными группами боковой цепи, указанными в скобках, перечислены ниже.

Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH (Dab=2,4-диаминомастная кислота); Fmoc-Dap(Boc)-OH (Dap=2,3-диаминопропионовая кислота); Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-t-Hyp(tBu)-OH (t-Hyp=транс-4-гидроксипролин); 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 (Sar=саркозин или [N-Me]Gly); Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH. Процедуры "Способа А Symphony" описывают эксперимент, выполненный в масштабе 0,050-0,100 ммоль, где масштаб определяется замещением смолы. Эта шкала соответствует приблизительно 143-286 мг или 70-140 мг смол Ринка или Зибер-Меррифилда, соответственно, описанных выше. Все процедуры можно масштабировать за пределы шкалы 0,050-0,100 ммоль, отрегулировав описанные объемы кратно масштабу. Перед аминокислотным связыванием все последовательности синтеза пептидов начинались с процедуры набухания смолы, описанной ниже как "Процедура набухания". В связывании аминокислот с N-концом первичного амина применяли "Процедуру стандартного связывания", описанную ниже. При связывании аминокислот с N-концом вторичного амина применяли процедуру "Связывание со вторичным амином", описанную ниже.

Процедура набухания смолы.

В полипропиленовый реакционный сосуд Symphony добавляли смолу Меррифилда Ринка или Зибер (70 мг, 0,050 ммоль или 140 мг, 0,100 ммоль). Эту смолу промывали (проводили процесс набухания) три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5-5,0 мл), после чего смесь периодически перемешивали барботированием N<sub>2</sub> со дна реакционного сосуда в течение 10 мин, затем растворитель сливали через фритту.

Процедура стандартного связывания.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5-5,0 мл), после чего смесь периодически перемешивали барботированием N<sub>2</sub> со дна реакционного сосуда в течение 30 с, затем растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5-5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 мин и затем раствор сливали через фритту. Процедуру повторяли еще один раз. Смолу промывали 6 раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,5-5,0 мл) через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, прежде чем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд

добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,25-2,5 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25-2,5 мл, 5 экв.) и, в конце, NMM (0,8 М в DMF, 1,25-2,5 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 1 ч, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали DMF (2,5-5,0 мл) пять раз, каждый раз перемешивая его в течение 30 с. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида: DIEA:DMF (10:5:85 об./об./об., 2,5-5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 20 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали пять раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,5-5,0 мл) через верх сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 90 с, прежде чем раствор сливали через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Процедура связывания со вторичным амином.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5-5,0 мл), после чего смесь периодически перемешивали барботированием N<sub>2</sub> со дна реакционного сосуда в течение 30 с, затем растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5-5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 мин и затем раствор сливали через фритту. Процедуру повторяли еще один раз. Смолу промывали 6 раз следующим образом: для каждой промывки DMF (2,5-5,0 мл) добавляли через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, прежде чем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 2,5-5,0 мл, 10 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 2,5-5,0 мл, 10 экв.) и, в конце, NMM (0,8 М в DMF, 2,5-5,0 мл, 20 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 1 ч, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали DMF (2,5-5,0 мл) пять раз, каждый раз перемешивая его в течение 30 с. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида: DIEA:DMF (10:5:85 об./об./об., 2,5-5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 20 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали пять раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,5-5,0 мл) через верх сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 90 с, затем раствор сливали через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Процедура связывания со вторичным амином без снятия защиты Fmoc.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5-5,0 мл), после чего смесь периодически перемешивали барботированием N<sub>2</sub> со дна реакционного сосуда в течение 30 с, затем растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 2,5-5,0 мл, 10 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 2,5-5,0 мл, 10 экв.) и, в конце, NMM (0,8 М в DMF, 2,5-5,0 мл, 20 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 6 ч, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали DMF (2,5-5,0 мл) пять раз, каждый раз перемешивая его в течение 30 с. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида: DIEA:DMF (10:5:85 об./об./об., 2,5-5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 20 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали пять раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,5-5,0 мл) через верх сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 90 с, затем раствор сливали через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Процедура экпирования ацетилхлоридом.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5-5,0 мл), после чего смесь периодически перемешивали барботированием N<sub>2</sub> со дна реакционного сосуда в течение 30 с, затем растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5-5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали однократно DMF (2,5-5,0 мл). В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5-5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали 6 раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,5-5,0 мл) через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли NMM (0,8 М в DMF, 3,0 мл, 48 экв.) с последующим добавлением хлоруксусного ангидрида (0,4 М в DMF, 3,0 мл, 24 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 30 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали однократно DMF (4,0 мл). В реакционный сосуд добавляли NMM (0,8 М в DMF, 3,0 мл, 48 экв.) с последующим добавлением хлоруксусного ангидрида (0,4 М в DMF, 3,0 мл, 24 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 30 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали 6 раз DMF (3,0 мл) с периодическим перемешиванием смеси в течение 30 с, затем раствор сливали через фритту. Смолу затем промывали пять раз DCM (3,0 мл) с периодическим перемешиванием полученной в результате смеси в течение 30 с, затем раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу затем высушивали в потоке азота в течение 10 мин.

Способ В "Symphony".

Все манипуляции выполнялись автоматически на синтезаторе пептидов Symphony (Protein Technologies). Все методики, если не указано иное, выполнялись в 20 мл полипропиленовой пробирке Symphony, оснащенной нижней фриттой. Пробирка соединяется с синтезатором пептидов Symphony как че-

рез нижнюю, так и через верхнюю часть пробирки. Все растворители, DMF, DCM, аминокислоты и реагенты добавляли через дно пробирки и пропускали через фритту для контакта с смолой. Все растворы удаляли через дно пробирки. "Периодическое перемешивание" описывает короткий импульс газообразного N<sub>2</sub> через нижнюю фритту; импульс длится примерно 5 с и происходит каждые 15 с. Растворы аминокислот обычно не использовались более трех недель после приготовления. Раствор HATU использовали в течение 5 дней после приготовления. DMF=диметилформамид; HCTU=2-(6-хлор-1-Н-бензотиазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионий; HATU=1-[бис(диметиламино)метиле]-1Н-1,2,3-триазол[4,5-*b*]пиридиний 3-оксидгексафторфосфат; NMM=*n*-метилморфолин; DIPEA=диизопропилэтиламин; смола Зиберы=Fmoc-аминоксантен-3-илокси, где "3-илокси" описывает положение и тип соединения с полистирольной смолой. Используемые смолы представляют собой полимер Меррифилда (полистирол) с линкером Зиберы (Fmoc-защищенный на азоте); 100-200 меш, 1% DVB, введение 0,71 ммоль/г. Другие типичные кислотночувствительные смолы, такие как смола Ринка или функционализированная хлортритильная смола, также могут быть использованы в синтезе. Используемые типичные аминокислоты с защитными группами боковой цепи, указанными в скобках, перечислены ниже.

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-t-Hyp(tBu)-OH (t-Hyp=транс-4-гидроксипролин; 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. Процедуры "Способа В Symphony" описывают эксперимент, выполненный в масштабе 0,10 ммоль, где масштаб определяется количеством линкера Зиберы, связанного со смолой. Эта шкала соответствует приблизительно 140 мг смолы Зиберы-Меррифилда, описанной выше. Все процедуры можно масштабировать за пределы шкалы 0,10 ммоль, отрегулировав описанные объемы кратно масштабу. Перед аминокислотным связыванием все последовательности синтеза пептидов начинались с процедуры набухания смолы, описанной ниже как "Процедура набухания". В связывании аминокислот с N-концом первичного амина применяли "Процедуру стандартного связывания", описанную ниже. При связывании аминокислот с N-концом вторичного амина применяли "Процедуру связывания со вторичным амином В", нестандартные аминокислоты связываются путем добавления вручную заготовки аминокислоты с помощью "Процедуры связывания выбранных аминокислот", описанной ниже, и ацетилхлорид добавляют в конечное положение последовательности, используя "Процедуру конечного кэпирования", описанную ниже.

Процедура набухания смолы.

В полипропиленовый реакционный сосуд Symphony добавляли смолу Меррифилда Зиберы (140 мг, 0,100 ммоль). Эту смолу промывали (проводили процесс набухания) три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5-5,0 мл), после чего смесь периодически перемешивали барботированием N<sub>2</sub> со дна реакционного сосуда в течение 10 мин, затем растворитель сливали через фритту.

Процедура стандартного связывания.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего смесь периодически перемешивали барботированием N<sub>2</sub> со дна реакционного сосуда в течение 30 с, затем растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 мин и затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали 6 раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,5 мл) через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 10 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 10 экв.) и, в конце, NMM (0,8 М в DMF, 2,5 мл, 20 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 30 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали 6 раз следующим образом: добавляли DMF (2,5 мл) через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/DMF (об./об./об., 1:1:3, 2,5 мл), смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали шесть раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,5 мл) через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 90 с, затем раствор сливали через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Процедура связывания со вторичным амином.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего смесь периодически перемешивали барботированием N<sub>2</sub> со дна реакционного сосуда в течение 30 с, затем растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 мин и затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали 6 раз следующим

образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,5 мл) через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 10 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 10 экв.) и, в конце, NMM (0,8 М в DMF, 2,5 мл, 20 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 1 ч, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали DMF (6,25 мл), добавляя через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 10 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 10 экв.) и, в конце, NMM (0,8 М в DMF, 2,5 мл, 20 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 60 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали три раза следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,5 мл) через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли  $\text{As}_2\text{O}/\text{DIPEA}/\text{DMF}$  (об./об./об., 1:1:3, 2,5 мл), смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали шесть раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,5 мл) через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 90 с, затем раствор сливали через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Процедура связывания выбранных аминокислот.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего смесь периодически перемешивали барботированием  $\text{N}_2$  со дна реакционного сосуда в течение 30 с, затем растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 10 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 10 экв.) и, в конце, NMM (0,8 М в DMF, 2,5 мл, 20 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 6 ч, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали 6 раз следующим образом: добавляли DMF (2,5 мл) через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли  $\text{As}_2\text{O}/\text{DIPEA}/\text{DMF}$  (об./об./об., 1:1:3, 2,5 мл), смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали шесть раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,5 мл) через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 90 с, затем раствор сливали через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Процедура конечного кэпирования.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего смесь периодически перемешивали барботированием  $\text{N}_2$  со дна реакционного сосуда в течение 30 с, затем растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5-5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали однократно DMF (2,5-5,0 мл). В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5-5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали шесть раз следующим образом: для каждой промывки DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли NMM (0,8 М в DMF, 2,5 мл, 20 экв.) с последующим добавлением хлоруксусного ангидрида (0,4 М в DMF, 2,5 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали DMF (6,25 мл), добавляя через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, прежде чем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли NMM (0,8 М в DMF, 2,5 мл, 10 экв.) с последующим добавлением хлоруксусного ангидрида (0,4 М в DMF, 2,5 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали 6 раз следующим образом: DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли  $\text{As}_2\text{O}/\text{DIPEA}/\text{DMF}$  (об./об./об., 1:1:3, 2,5 мл), смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали шесть раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,5 мл) через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, затем раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали четыре раза следующим образом: для каждой промывки добавляли DCM (2,5 мл) через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, прежде чем раствор сливали через фритту. Полученную смолу затем высушивали в потоке азота в течение 10 мин.

Процедуры синтеза вручную.

Связывание с бромуксусной кислотой.

Все манипуляции выполнялись вручную при комнатной температуре, если не указано иное. Смолу промывали три раза следующим образом: смолы из четырех 0,100 ммоль по размеру синтезов Symphony, используемых для получения промежуточных смол А и В, соединяли в 50-мл реакторе из фриттового стекла, оборудованном трехходовым краном, и три раза промывали DMF (10 мл) с перемешиванием пу-

тем барботирования  $N_2$  со дна реакционного сосуда. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 10,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 мин и затем раствор сливали через фритту. Эту процедуру повторяли еще один раз. Смолу промывали 6 раз DMF (10,0 мл). В реакционный сосуд добавляли раствор бромуксусной кислоты (10,0 экв.) в DMF (5,0 мл) и DIC (10,3 экв.). Смесь перемешивали барботированием  $N_2$  в течение 1 ч, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали DMF (5,0 мл) пять раз. Полученную смолу суспендировали в DCM/DMF (3:2) и разделяли по объему на семь равных частей (0,057 ммоль), которые переносили в 25 мл шприцы с насадкой из фритты. Каждую аликвоту смолы использовали непосредственно на следующей стадии N-алкилирования на смоле.

N-Gly-алкилирование на смоле, способ А.

Все манипуляции выполнялись вручную при комнатной температуре, если не указано иное. К смоле со стадии бромацетилирования (0,057 ммоль) добавляли раствор требуемого амина (10 экв.) и DIEA (11 экв.) в DMF (мл), и полученную в результате смесь перемешивали в течение 1 ч. Смолу промывали пять раз DMF (10 мл). Процедуру повторяли еще раз. В случае использования хлористоводородной соли амина, применяли дополнительные 10 экв. DIEA. Протекание реакции контролировали микрорасщеплением TFA небольших образцов смолы. После завершения реакции N-алкилированную смолу промывали пять раз DMF (10 мл) и помещали обратно в реакционный сосуд Symphony для завершения сборки последовательности в синтезаторе пептидов Symphony.

N-Gly-алкилирование на смоле, способ В.

Все манипуляции выполнялись вручную при комнатной температуре, если не указано иное. К смоле со стадии бромацетилирования (0,057 ммоль) добавляли раствор требуемого амина (10 экв.) и DIEA (11 экв.) в DMF (мл), и полученную в результате смесь перемешивали в течение 1 ч. Смолу промывали пять раз DMF (10 мл). Процедуру повторяли еще раз. В случае использования хлористоводородной соли амина, применяли дополнительные 10 экв. DIEA. Смолу затем обрабатывали раствором амина (10-20 экв.) и DMAP (21 экв.) в течение от 1 до 16 ч. Протекание реакции контролировали микрорасщеплением TFA небольших образцов смолы. После завершения реакции N-алкилированную смолу промывали пять раз DMF (10 мл) и помещали обратно в реакционный сосуд Symphony для завершения сборки последовательности в синтезаторе пептидов Symphony.

N-Gly-алкилирование на смоле, способ С.

Все манипуляции выполнялись вручную при комнатной температуре, если не указано иное. Эту стадию использовали, когда требуемый амин представлял собой этиламин. К смоле со стадии бромацетилирования (0,057 ммоль) добавляли раствор этиламина гидрохлорида (10 экв.) и DIEA (21 экв.) в DMF (мл), и полученную в результате смесь перемешивали в течение 1 ч. Смолу промывали пять раз DMF (10 мл). Процедуру повторяли еще раз. Смолу затем обрабатывали 2 М раствором этиламина в THF (10 мл) в течение 16 ч. Протекание реакции контролировали микрорасщеплением TFA небольших образцов смолы. После завершения реакции N-алкилированную смолу промывали пять раз DMF (10 мл) и помещали обратно в реакционный сосуд Symphony для завершения сборки последовательности в синтезаторе пептидов Symphony.

N-Gly-алкилирование на смоле, способ D.

Все манипуляции выполнялись вручную при комнатной температуре, если не указано иное. К бромацетилированной смоле (0,100 ммоль) добавляли раствор требуемого амина (10 экв., 1,0 ммоль) и DBU (5 экв., 0,5 ммоль) в DMF (3 мл), и полученную в результате смесь перемешивали в течение 3 ч. Смолу однократно промывали DMF (5 мл). Процедуру повторяли еще раз, но реакцию оставляли протекать в течение 16 ч. Смолу промывали четыре раза DMF (4 мл) и DCM (4 мл) и затем помещали обратно в реакционный сосуд Symphony для завершения сборки последовательности в синтезаторе пептидов Symphony.

Способ алкилирования А.

Раствор спирта, соответствующего алкилирующей группе (0,046 г, 1,000 ммоль), трифенилфосфина (0,131 г, 0,500 ммоль) и DIAD (0,097 мл, 0,500 ммоль) в 3 мл THF, добавляли к нозилированной смоле (0,186 г, 0,100 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Смолу промывали три раза THF (5 мл), и указанную выше процедуру повторяли 1-3 раза. Протекание реакции контролировали микрорасщеплением TFA небольших образцов смолы, обработанных раствором 50 мкл TIS в 1 мл TFA в течение 1,5 ч.

Способ алкилирования В.

Нозилированную смолу (0,100 ммоль) промывали три раза N-метилпирролидоном (NMP) (3 мл). К смоле добавляли раствор NMP (3 мл), алкилбромид (20 экв., 2,000 ммоль) и DBU (20 экв., 0,301 мл, 2,000 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Смолу промывали NMP (3 мл), и указанную выше процедуру повторяли один раз. Протекание реакции контролировали микрорасщеплением TFA небольших образцов смолы, обработанных раствором 50 мкл TIS в 1 мл TFA в течение 1,5 ч.

Образование нозилата.

Раствор коллидина (10 экв.) в DCM (2 мл) добавляли к смоле с последующим добавлением раствора Nos-Cl (8 экв.) в DCM (1 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной темпера-

туре. Смолу промывали три раза DCM (4 мл) и три раза DMF (4 мл). Чередующиеся промывания DCM и DMF повторяли три раза, с последующими конечными четырьмя промываниями DCM (4 мл).

Удаление нозилата.

Набухание смолы (0,100 ммоль) проводили с использованием трех промывок DMF (3 мл) и трех промывок NMP (3 мл). Раствор NMP (3 мл), DBU (0,075 мл, 0,500 ммоль) и 2-меркаптоэтанола (0,071 мл, 1,000 ммоль) добавляли к смоле, и реакционную смесь перемешивали в течение 5 мин при комнатной температуре. После фильтрования и промывания NMP (3 мл) смолу повторно обрабатывали раствором NMP (3 мл), DBU (0,075 мл, 0,500 ммоль) и 2-меркаптоэтанола (0,071 мл, 1,000 ммоль) в течение 5 мин при комнатной температуре. Смолу промывали три раза NMP (3 мл), четыре раза DMF (4 мл) и четыре раза DCM (4 мл), и помещали обратно в реакционный сосуд Symphony для завершения сборки последовательности в синтезаторе пептидов Symphony.

Процедура связывания с хлорацетилхлоридом.

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 мин и затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 5 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (5,0 мл) через верх сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли 3,5 мл раствора DIPEA (40 экв.) и хлорацетилхлорида (20 экв.) в DMF. Смесь периодически перемешивали в течение 3 ч, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно пять раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (5,0 мл) через верх сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 60 с, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: для каждой промывки добавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5,0 мл) через верх сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 60 с, затем раствор сливали через фритту. Смолу затем высушивали под высоким вакуумом.

Способ А, СЕМ.

Все манипуляции выполнялись автоматически на микроволновом пептидном синтезаторе СЕМ Liberty (СЕМ Corporation). Все стадии, если не указано, были выполнены в 30 или 125 мл полипропиленовой пробирке, снабженной нижней фриттой, для микроволнового блока СЕМ Discovery. Пробирка соединяется с синтезатором СЕМ Liberty как через нижнюю, так и через верхнюю часть пробирки. DMF и DCM могут добавляться через верх и дно пробирки, что позволяет равномерно омывать боковые стороны пробирки. Все растворы удаляются через дно пробирки, за исключением случая, когда смола переносится через верх. "Периодическое барботирование" описывает кратковременное барботирование газообразного  $\text{N}_2$  через нижнюю фритту. Растворы аминокислот обычно не использовались дольше трех недель после приготовления. Раствор HATU использовали в течение 5 дней после приготовления. DMF=диметилформамид; HCTU=2-(6-хлор-1-Н-бензотиазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний; HATU=1-[бис(диметиламино)метилден]-1Н-1,2,3-триазол[4,5-б]пиридиний 3-оксидгексафторфосфат; DIPEA=диизопропилэтиламин; смола Зибера=Fmoc-аминоксантен-3-илокси, где "3-илокси" описывает положение и тип соединения с полистирольной смолой. Используемые смолы представляют собой полимер Меррифилда (полистирол) с линкером Зибера (Fmoc-защищенный на азоте); 100-200 меш, 1% DVB, введение 0,71 ммоль/г. Используемые типичные аминокислоты с защитными группами боковой цепи, указанными в скобках, перечислены ниже.

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.

Процедуры "Способа А СЕМ" описывают эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяется количеством линкера Зибера, связанного со смолой. Эта шкала соответствует приблизительно 140 мг смолы Зибера-Меррифилда, описанной выше. Все процедуры можно масштабировать за пределы шкалы 0,100 ммоль, отрегулировав описанные объемы кратно масштабу. Перед аминокислотным связыванием все последовательности синтеза пептидов начинались с процедуры набухания смолы, описанной ниже как "Процедура набухания смолы". В связывании аминокислот с N-концом первичного амина применяли "Процедуру стандартного связывания", описанную ниже. При связывании аминокислот с N-концом вторичного амина применяли "Процедуру связывания со вторичным амином", описанную ниже. Связывание хлорацетильной группы с N-концом пептида описывается "Процедурой связывания с хлорацетилхлоридом" или "Процедурой связывания с хлоруксусной кислотой", подробно описанными выше.

Процедура набухания смолы.

В 50-мл полипропиленовую коническую пробирку добавляли смолу Меррифилда:Зибера (140 мг, 0,100 ммоль). Затем в пробирку добавляли DMF (7 мл) с последующим добавлением DCM (7 мл). Смолу

затем переносили в реакционный сосуд через верх сосуда. Процедуру повторяли дополнительно два раза. Добавляли DMF (7 мл) с последующим добавлением DCM (7 мл). Смолу оставляли набухать с барботированием  $N_2$  со дна реакционного сосуда в течение 15 мин, затем растворитель сливали через фритту.

Процедура стандартного связывания.

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 мин и затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывали DMF (7,0 мл) через верх сосуда с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно сосуда, и, в конце, промывали DMF (7 мл) через верх сосуда. 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  $N_2$  в течение 5 мин при 75°C для всех аминокислот, за исключением Fmoc-Cys(Trt)-OH и Fmoc-His(Trt)-OH, которые связывались при 50°C, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывали DMF (7,0 мл) через верх сосуда с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно сосуда, и, в конце, промывали DMF (7 мл) через верх сосуда. 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, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывали DMF (7,0 мл) через верх сосуда с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно сосуда, и, в конце, промывали DMF (7 мл) через верх сосуда. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Процедура двойного связывания.

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 мин и затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывали DMF (7,0 мл) через верх сосуда с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно сосуда, и, в конце, промывали DMF (7 мл) через верх сосуда. 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  $N_2$  в течение 5 мин при 75°C для всех аминокислот, за исключением Fmoc-Cys(Trt)-OH и Fmoc-His(Trt)-OH, которые связывались при 50°C, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывали DMF (7,0 мл) через верх сосуда с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно сосуда, и, в конце, промывали DMF (7 мл) через верх сосуда. 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, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывали DMF (7,0 мл) через верх сосуда с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно сосуда, и, в конце, промывали DMF (7 мл) через верх сосуда. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Процедура связывания выбранных аминокислот.

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 мин и затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывали DMF (7,0 мл) через верх сосуда с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно сосуда, и, в конце, промывали DMF (7 мл) через верх сосуда. В реакционный сосуд добавляли раствор аминокислоты (от 1,25 до 5,0 мл, от 2,5 до 10 экв.), содержащий HATU (от 2,5 до 10 экв.) и, в конце, DIPEA (2 М в NMP, от 0,5 до 1,0 мл, 20 экв.). Смесь перемешивали барботированием  $N_2$  в течение от 5 мин до 2 ч при температуре от 25 до 75°C, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывали DMF (7,0 мл) через верх сосуда с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно сосуда, и, в конце, промывали DMF (7 мл) через верх сосуда. 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, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывали DMF (7,0 мл) через верх сосуда с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно сосуда, и, в конце, промывали DMF (7 мл) через верх сосуда. Полученную смолу использовали непо-

средственно на следующей стадии.

Процедура связывания с хлорацетилхлоридом.

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 мин и затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно пять раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (4,0 мл) через верх сосуда, полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, и затем раствор сливали 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 от 12 до 18 ч, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (4,0 мл) через верх сосуда, полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 90 с, и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждой промывки добавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2,0 мл) через верх сосуда, полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 90 с, и затем раствор сливали через фритту.

Способ снятия всей защиты А.

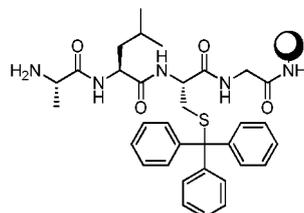
Все манипуляции выполнялись вручную при комнатной температуре, если не указано иное. Методика "Способ снятия всей защиты А" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,057-0,100 ммоль, где масштаб определяется количеством линкера Ринка или Зибера, связанного со смолой. Процедуру можно масштабировать за пределы шкалы 0,057-0,100 ммоль, отрегулировав описанные объемы кратно масштабу. "Раствор для снятия защиты" был приготовлен с использованием трифторуксусной кислоты: триизопропилсилана: дитиотреитола (95:2,5:2,5 об./об./мас.) или трифторуксусной кислоты: триизопропилсилана: дитиотреитола (96,5:2,5:1,0 об./об./мас.). Раствор предварительно охлаждали на льду перед добавлением его к смоле. К смоле в 25 мл шприце с фриттой добавляли "раствор для снятия защиты" (2,5-4,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 60 мин. Раствор фильтровали через фритту в холодный диэтиловый эфир (30 мл). Осажденное твердое вещество центрифугировали в течение 3 мин. Супернатантный раствор сливали, и твердое вещество повторно суспендировали в диэтиловом эфире (15 мл). Эту процедуру повторяли еще два раза. Супернатант сливали, и оставшееся твердое вещество высушивали под высоким вакуумом. Неочищенный пептид получали в виде от белого до не совсем белого твердого вещества.

Способ циклизации А.

Все манипуляции выполнялись вручную, если не указано иное. Методика "Способ циклизации А" описывает эксперимент, выполненный в пределах 0,057-0,100 ммоль. Неочищенный твердый пептид растворяли в растворе ацетонитрил:водный 0,1 М аммоний-бикарбонатный буфер (1:3 или 1:2, об.:об., 30-40 мл), и pH раствора осторожно доводили до 8,5-9,0, применяя водный NaOH (1,0 М). Раствор затем перемешивали, используя шейкер, в течение 12-18 ч. Реакционный раствор концентрировали, и остаток затем растворяли в ацетонитриле:воде. Этот раствор подвергали очистке путем обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением целевого циклического пептида.

Получение промежуточных смол для примеров 3003-3050.

Получение промежуточной смолы А



В 20-мл реакционный сосуд Symphony добавляли смолу Зибера (0,100 ммоль), и сосуд помещали в синтезатор пептидов Symphony. Затем последовательно выполнялись следующие процедуры:

Fmoc-Gly-OH "Способ В Symphony: процедура набухания смолы";

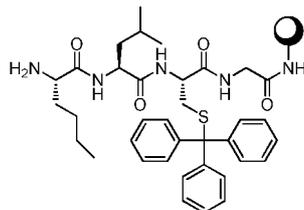
Fmoc-Cys(Trt)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания";

Fmoc-Leu-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания";

Fmoc-Ala-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания".

Группу Fmoc удаляли, применяя 20% пиперидин/DMF (5 мл) в течение 5 мин с периодическим перемешиванием азотом. Смолу промывали DMF (2,5 мл), и затем к смоле добавляли 20% пиперидин/DMF (5 мл), и продолжали периодическое перемешивание азотом в течение 5 мин. Полученную смолу промывали шесть раз DMF (2,5 мл), затем пять раз DCM (2,5 мл), и использовали в качестве промежуточного соединения для процессов N-алкилирования.

## Получение промежуточной смолы В

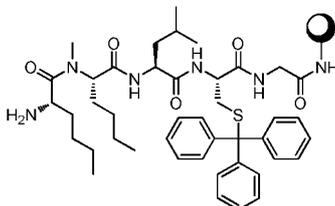


В 20-мл реакционный сосуд Symphony добавляли смолу Зибера (0,100 ммоль), и сосуд помещали в синтезатор пептидов Symphony. Затем последовательно выполнялись следующие процедуры:

- Fmoc-Gly-OH "Способ В Symphony: процедура набухания смолы";
- Fmoc-Cys(Trt)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания";
- Fmoc-Leu-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания";
- Fmoc-Nle-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания".

Группу Fmoc удаляли, применяя 20% пиперидин/DMF (5 мл) в течение 5 мин с периодическим перемешиванием азотом. Смолу промывали DMF (2,5 мл), и затем к смоле добавляли 20% пиперидин/DMF (5 мл), и продолжали периодическое перемешивание азотом в течение 5 мин. Полученную смолу промывали шесть раз DMF (2,5 мл), затем пять раз DCM (2,5 мл), и использовали в качестве промежуточного соединения для процессов N-алкилирования.

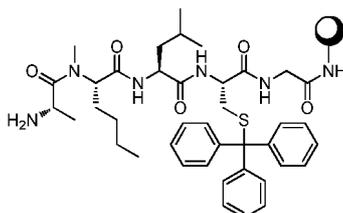
## Получение промежуточной смолы С.



В 20-мл реакционный сосуд Symphony добавляли смолу Зибера (0,100 ммоль), и сосуд помещали в синтезатор пептидов Symphony. Затем последовательно выполнялись следующие процедуры:

Fmoc-Gly-OH "Способ В Symphony: процедура набухания смолы"; Fmoc-Cys(Trt)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Leu-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-n-Метил-Ме-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Nle-OH "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином". Группу Fmoc удаляли, применяя 20% пиперидин/DMF (5 мл) в течение 5 мин с периодическим перемешиванием азотом. Смолу промывали DMF (2,5 мл), и затем к смоле добавляли 20% пиперидин/DMF (5 мл), и продолжали периодическое перемешивание азотом в течение 5 мин. Полученную смолу промывали шесть раз DMF (2,5 мл), затем пять раз DCM (2,5 мл), и использовали в качестве промежуточного соединения для процессов N-алкилирования.

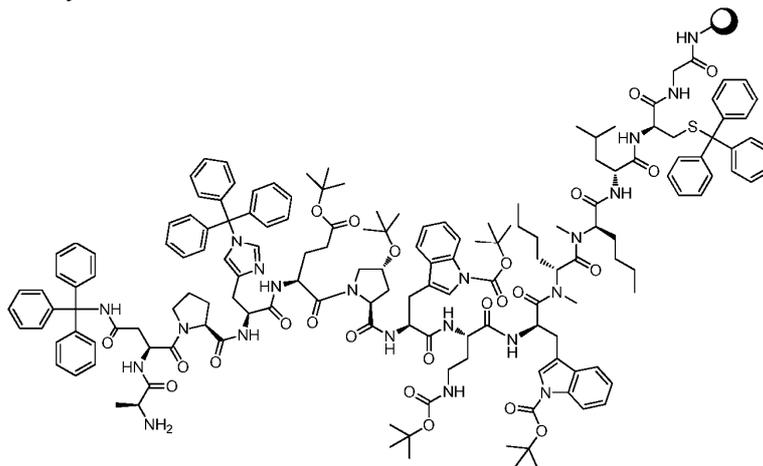
## Получение промежуточной смолы D



В 20-мл реакционный сосуд Symphony добавляли смолу Зибера (0,100 ммоль), и сосуд помещали в синтезатор пептидов Symphony. Затем последовательно выполнялись следующие процедуры:

Fmoc-Gly-OH "Способ В Symphony: процедура набухания смолы"; Fmoc-Cys(Trt)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Leu-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-n-Метил-Ме-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Ala-OH "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином". Группу Fmoc удаляли, применяя 20% пиперидин/DMF (5 мл) в течение 5 мин с периодическим перемешиванием азотом. Смолу промывали DMF (2,5 мл) и затем к смоле добавляли 20% пиперидин/DMF (5 мл), и продолжали периодическое перемешивание азотом в течение 5 мин. Полученную смолу промывали шесть раз DMF (2,5 мл), затем пять раз DCM (2,5 мл), и использовали в качестве промежуточного соединения для процессов N-алкилирования.

## Получение промежуточной смолы E

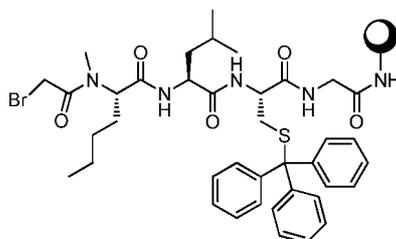


В 20-мл реакционный сосуд Symphony добавляли смолу Зибера (0,100 ммоль), и сосуд помещали в синтезатор пептидов Symphony. Затем последовательно выполнялись следующие процедуры:

Fmoc-Gly-OH "Способ В Symphony: процедура набухания смолы"; Fmoc-Cys(Trt)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Leu-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-n-Метил-Ме-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-n-Метил-Ме-OH "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином";

Fmoc-Trp(Вос)-OH "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; Fmoc-Dab(Вос)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Trp(Вос)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Hyp(tBu)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Glu(tBu)-OH "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; Fmoc-His(Trt)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Pro-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Asn(Trt)-OH "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; Fmoc-Ala-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания". Группу Fmoc удаляли, применяя 20% пиперидин/DMF (5 мл) в течение 5 мин с периодическим перемешиванием азотом. Смолу промывали DMF (2,5 мл) и затем к смоле добавляли 20% пиперидин/DMF (5 мл), и продолжали периодическое перемешивание азотом в течение 5 мин. Полученную смолу промывали шесть раз DMF (2,5 мл), затем пять раз DCM (2,5 мл), и использовали в качестве промежуточного соединения для процессов N-алкилирования.

## Получение промежуточной смолы F



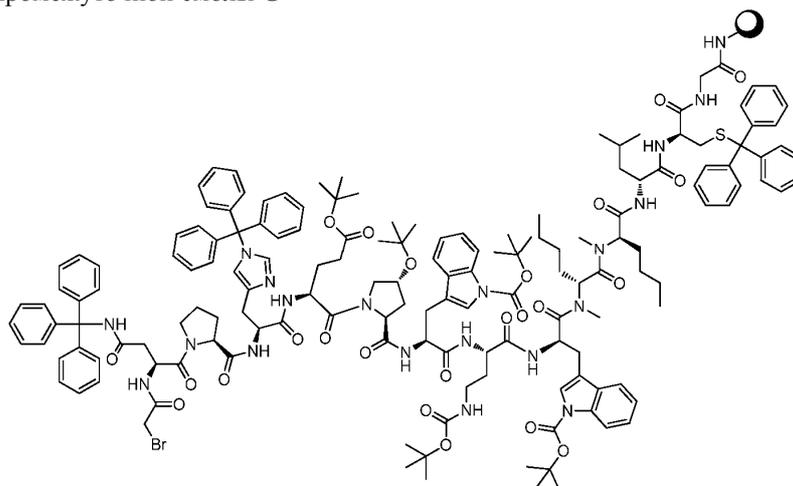
В 20-мл реакционный сосуд Symphony добавляли смолу Зибера (0,100 ммоль), и сосуд помещали в синтезатор пептидов Symphony. Затем последовательно выполнялись следующие процедуры:

Fmoc-Gly-OH "Способ В Symphony: процедура набухания смолы";

Fmoc-Cys(Trt)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания";

Fmoc-Leu-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-n-Метил-Ме-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания". Группу Fmoc удаляли, применяя 20% пиперидин/DMF (5 мл) в течение 5 мин с периодическим перемешиванием азотом. Смолу промывали DMF (2,5 мл), затем к смоле добавляли 20% пиперидин/DMF (5 мл), и продолжали периодическое перемешивание азотом в течение 5 мин. Полученную смолу промывали шесть раз DMF (2,5 мл) и затем переносили в пробирку BioRad и обрабатывали следующим раствором: бромуксусной кислотой (10 экв., 1 ммоль) и DIC (11 экв., 1,1 ммоль) в DMF (3 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч. После фильтрации и промывания DMF (3 мл), смолу повторно обрабатывали следующим раствором: бромуксусной кислотой (10 экв., 1 ммоль) и DIC (11 экв., 1,1 ммоль) в DMF (3 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч. После фильтрации смолу промывали пять раз DMF (3,0 мл), затем пять раз DCM (2,5 мл), и использовали в качестве промежуточного соединения для процессов N-алкилирования.

## Получение промежуточной смолы G



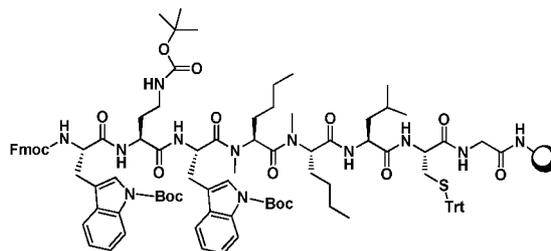
В 20-мл реакционный сосуд Symphony добавляли смолу Зибера (0,100 ммоль), и сосуд помещали в синтезатор пептидов Symphony. Затем последовательно выполнялись следующие процедуры:

Fmoc-Gly-OH "Способ В Symphony: процедура набухания смолы"; Fmoc-Cys(Trt)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Leu-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-n-Метил-Ме-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-n-Метил-Ме-OH "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином";

Fmoc-Trp(Boc)-OH "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; Fmoc-Dab(Boc)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Trp(Boc)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Hyp(tBu)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Glu(tBu)-OH "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; Fmoc-His(Trt)-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Pro-OH "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания"; Fmoc-Asn(Trt)-OH "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином".

Группу Fmoc удаляли, применяя 20% пиперидин/DMF (5 мл) в течение 5 мин с периодическим перемешиванием азотом. Смолу промывали DMF (2,5 мл) и затем к смоле добавляли 20% пиперидин/DMF (5 мл), и продолжали периодическое перемешивание азотом в течение 5 мин. Полученную смолу промывали шесть раз DMF (2,5 мл) и затем переносили в пробирку BioRad и обрабатывали следующим раствором: бромуксусной кислотой (10 экв., 1 ммоль) и DIC (11 экв., 1,1 ммоль) в DMF (3 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч. После фильтрования и промывания DMF (3 мл) смолу повторно обрабатывали следующим раствором: бромуксусной кислотой (10 экв., 1 ммоль) и DIC (11 экв., 1,1 ммоль) в DMF (3 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч. После фильтрования смолу промывали пять раз DMF (3,0 мл), затем пять раз DCM (2,5 мл), и использовали в качестве промежуточного соединения для процессов N-алкилирования.

## Получение промежуточной смолы H



В четыре реакционных сосуда Symphony добавляли смолу Ринка (мг, 0,100 ммоль), и сосуды помещали в синтезатор пептидов Symphony. Затем последовательно выполнялись следующие процедуры:

"Способ А Symphony: процедура набухания смолы";

"Способ А Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-Gly-OH;

"Способ А Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-Cys(Trt)-OH;

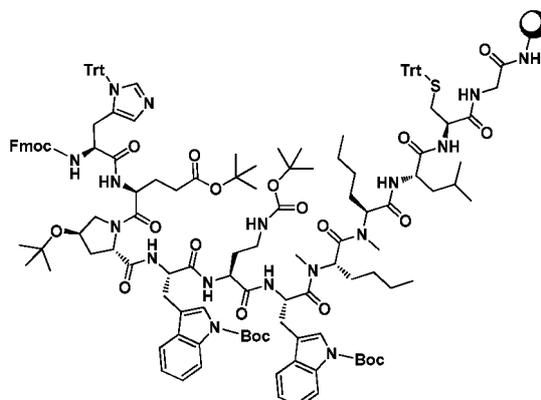
"Способ А Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-Leu-OH;

"Способ А Symphony: процедура связывания со вторичным амином" проводили с Fmoc-[N-Me]Nle-OH;

"Способ А Symphony: процедура связывания со вторичным амином" проводили с Fmoc-[N-Me]Nle-OH;

"Способ А Symphony: процедура связывания со вторичным амином" проводили с Fmoc-Trp(Boc)-OH;

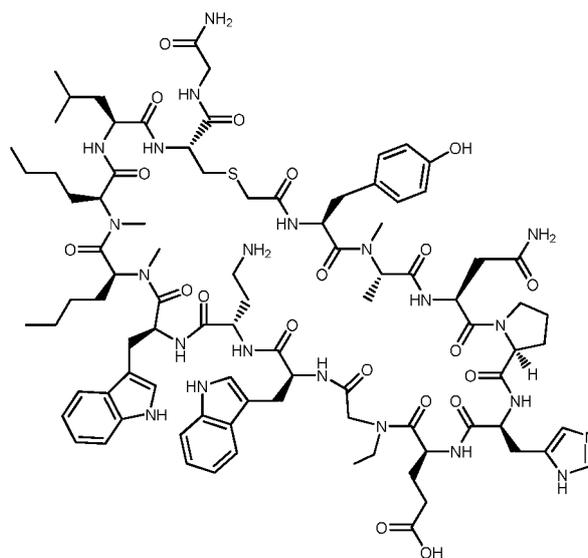
"Способ A Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-Dab(Boc)-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-Trp(Boc)-OH.  
 Полученные в результате смолы соединяли в 50-мл реакторе из фриттового стекла и промывали DMF, как описано выше в процедуре связывания с бромуксусной кислотой.  
 Получение промежуточной смолы I



В четыре реакционных сосуда Symphony добавляли смолу Ринка (мг, 0,100 ммоль), и сосуды помещали в синтезатор пептидов Symphony. Затем последовательно выполнялись следующие процедуры:

"Способ A Symphony: процедура набухания смолы";  
 "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-Gly-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-Cys(Trt)-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-Leu-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином" проводили с Fmoc-[N-Me]Nle-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином" проводили с Fmoc-[N-Me]Nle-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином" проводили с Fmoc-Trp(Boc)-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-Dab(Boc)-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-Trp(Boc)-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-t-Hyp(tBu)-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином" проводили с Fmoc-Glu(OtBu)-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-His(Trt)-OH.

Полученные в результате смолы соединяли в 50-мл реакторе из фриттового стекла и промывали DMF, как описано выше в процедуре связывания с бромуксусной кислотой.  
 Получение примера 3003



Пример 3003

Пример 3003 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной ниже, начиная с промежуточной смолы Н. Промежуточную смолу А (0,400 ммоль) помещали в 50-мл реактор из фриттового стекла. Затем последовательно выполнялись следующие процедуры:

"Процедура связывания с бромуксусной кислотой";  
 "N-Gly-алкилирование на смоле, способ С";  
 "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином без снятия защиты Fmoc" проводили с Fmoc-Glu(OtBu)-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-His(Trt)-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-Pro-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином" проводили с Fmoc-Asn(Trt)-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания" проводили с Fmoc-[N-Me]Ala-OH;  
 "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином" проводили с Fmoc-Tyr(tBu)-OH;  
 "Процедура кэпирования ацетилхлоридом";  
 "Способ снятия всей защиты А";  
 "Способ циклизации А".

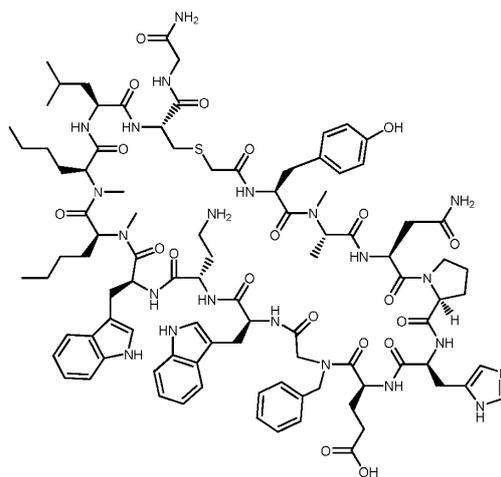
Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка:

XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 45-85% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 6,3 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 99%, применяя "ЖХ-МС анализ, условие D".

ЖХ-МС анализ, условие D: время удерживания=1,88 мин; ESI-MS(+) m/z 935,1 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 934,4692 (M+2H); найдено: 934,4674 (M+2H).

Получение примера 3004

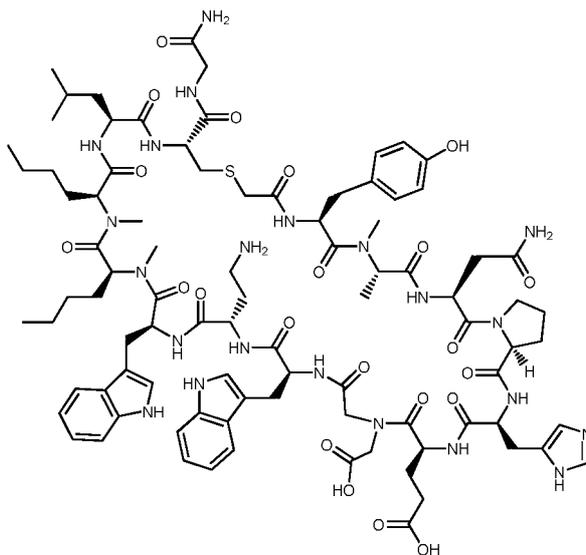


Пример 3004

Пример 3004 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3003, начиная с промежуточной смолы Н, используя следующие общие методики: "Процедура связывания с бромуксусной кислотой"; "N-Gly-алкилирование на смоле, способ А"; "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином без снятия защиты Fmoc"; "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания"; "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; "Процедура кэпирования ацетилхлоридом"; "Способ снятия всей защиты А"; "Способ циклизации А". Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 50-90% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 6,6 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 95%, применяя "ЖХ-МС анализ, условие D".

ЖХ-МС анализ, условие D: время удерживания=1,87 мин; ESI-MS(+) m/z 961,9 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 965,4771 (M+2H), найдено: 965,4754 (M+2H).

## Получение примера 3005

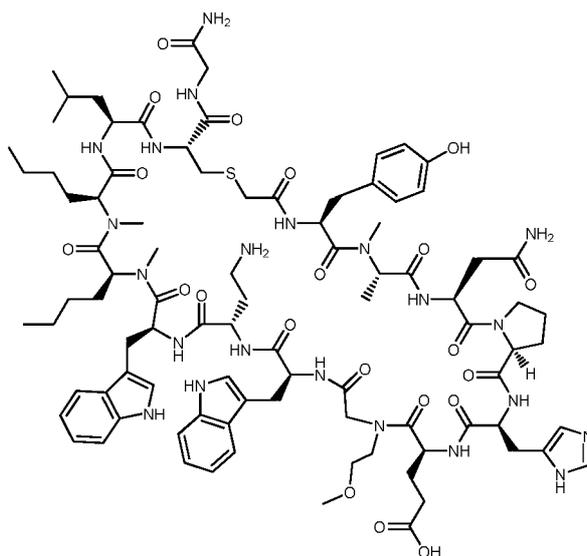


Пример 3005

Пример 3005 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3003, начиная с промежуточной смолы Н, используя следующие общие методики: "Процедура связывания с бромуксусной кислотой"; "N-Gly-алкилирование на смоле, способ В"; "Способ А Symphony: процедура связывания со вторичным амином без снятия защиты Fmoc"; "Способ А Symphony: процедура стандартного связывания"; "Способ А Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; "Процедура кэпирования ацетилхлоридом"; "Способ снятия всей защиты А"; "Способ циклизации А". Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 45-85% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 3,9 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 100%, применяя "ЖХ-МС анализ, условие D".

ЖХ-МС анализ, условие D: время удерживания=1,72 мин; ESI-MS(+) m/z 950,4 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 949,4563 (M+2H), найдено: 949,4547 (M+2H).

## Получение примера 3006



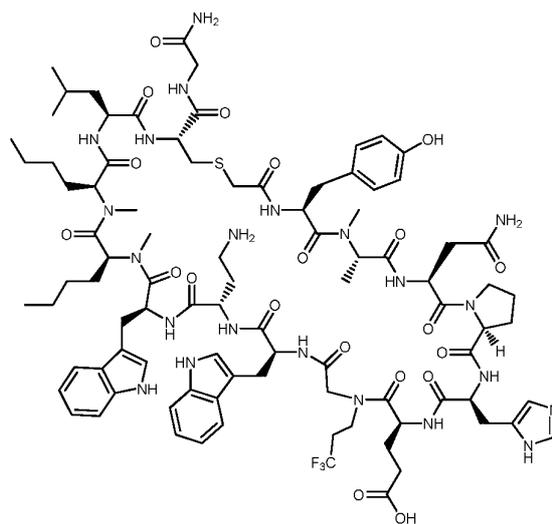
Пример 3006

Пример 3006 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3003, начиная с промежуточной смолы Н, используя следующие общие методики: "Процедура связывания с бромуксусной кислотой", "N-Gly-алкилирование на смоле, способ А"; "Способ А Symphony: процедура связывания со вторичным амином без снятия защиты Fmoc"; "Способ А Symphony: процедура стандартного связывания"; "Способ А Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; "Процедура кэпирования ацетилхлоридом"; "Способ снятия всей защиты А"; "Способ циклизации

А". Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 50-90% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 13,8 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 100%, применяя "ЖХ-МС анализ, условия D и E".

ЖХ-МС анализ, условие D: время удерживания=1,90 мин; ESI-MS(+) m/z 950,5 (M+2H). ЖХ-МС анализ, условие E: время удерживания=1,58 мин; ESI-MS(+) m/z 950,1 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 949,4745 (M+2H), найдено: 949,4725 (M+2H).

Получение примера 3007

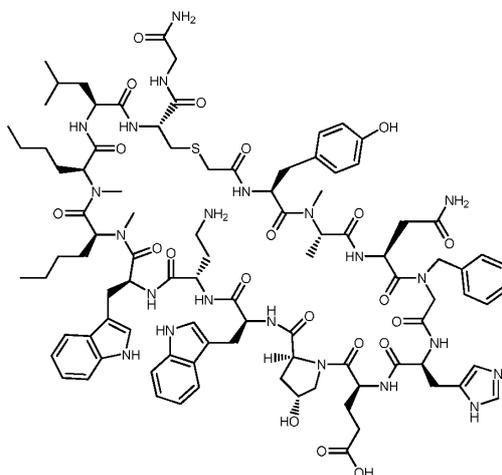


Пример 3007

Пример 3007 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3003, начиная с промежуточной смолы Н, используя следующие общие методики: "Процедура связывания с бромуксусной кислотой"; "N-Gly-алкилирование на смоле, способ В"; "Способ А Symphony: процедура связывания со вторичным амином без снятия защиты Fmoc"; "Способ А Symphony: процедура стандартного связывания"; "Способ А Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; "Процедура кэпирования ацетилхлоридом"; "Способ снятия всей защиты А"; "Способ циклизации А". Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 50-90% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 3,9 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 100%, применяя "ЖХ-МС анализ, условие D".

ЖХ-МС анализ, условие D: время удерживания=1,96 мин; ESI-MS(+) m/z 969,3 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 968,4629 (M+2H), найдено: 968,4617 (M+2H).

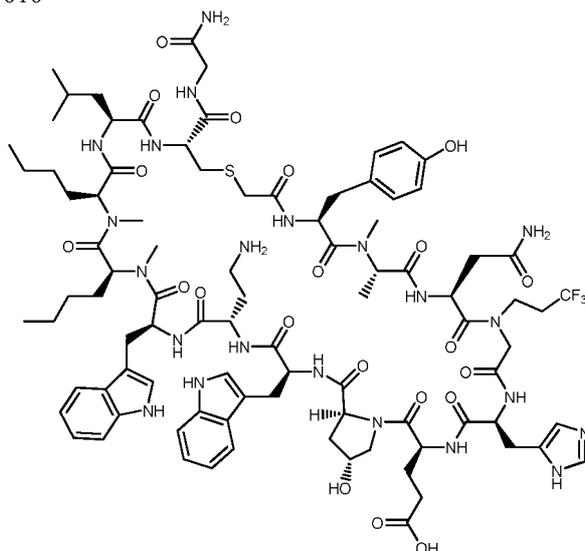
Получение примера 3008



Пример 3008



## Получение примера 3010

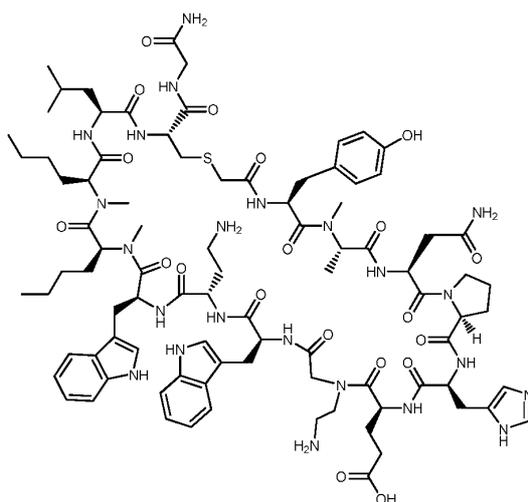


Пример 3010

Пример 3010 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3008, начиная с промежуточной смолы I, используя следующие общие методики: "Процедура связывания с бромуксусной кислотой"; "N-Gly-алкилирование на смоле, способ B"; "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином без снятия защиты Fmoc"; "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания"; "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; "Процедура кэпирования ацетилхлоридом"; "Способ снятия всей защиты A"; "Способ циклизации A". Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза A: 5:95 метанол:вода с 10 mM раствором ацетата аммония; подвижная фаза B: 95:5 метанол:вода с 10 mM раствором ацетата аммония; градиент: 50-90% B на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% B; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 4,7 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 97%, применяя "ЖХ-МС анализ, условие D".

ЖХ-МС анализ, условие D: время удерживания=1,83 мин; ESI-MS(+) m/z 977,7 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 976,4604 (M+2H), найдено: 976,4592 (M+2H).

## Получение примера 3011



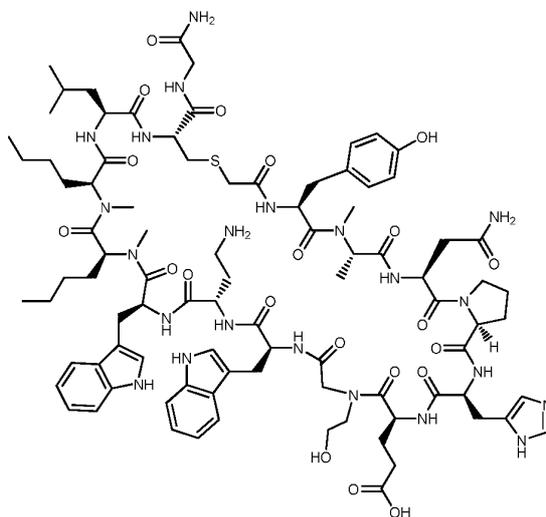
Пример 3011

Пример 3011 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3003, начиная с промежуточной смолы H, используя следующие общие методики: "Процедура связывания с бромуксусной кислотой"; "N-Gly-алкилирование на смоле, способ A"; "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином без снятия защиты Fmoc"; "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания"; "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; "Процедура кэпирования ацетилхлоридом"; "Способ снятия всей защиты A"; "Способ циклизации A". Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза A: 5:95 метанол:вода с 10 mM раствором ацетата аммония; под-

вижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 50-90% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 10,6 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 89%, применяя "ЖХ-МС анализ, условия D и E".

ЖХ-МС анализ, условие D: время удерживания=1,85 мин; ESI-MS(+) m/z 942,9 (M+2H). ЖХ-МС анализ, условие E: время удерживания=1,47 мин; ESI-MS(+) m/z 942,6 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 941,9723 (M+2H), найдено: 941,9747 (M+2H).

Получение примера 3012



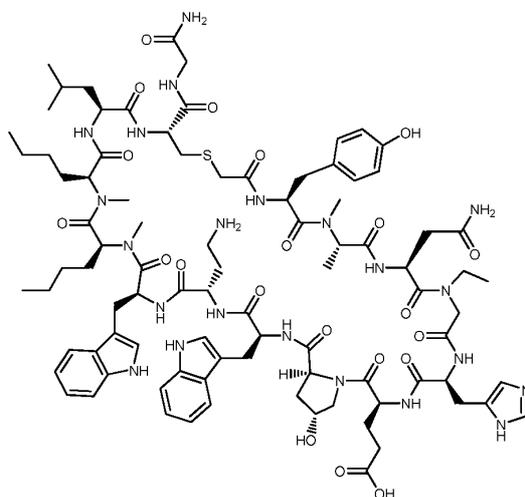
Пример 3012

Пример 3012 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3003, начиная с промежуточной смолы Н, используя следующие общие методики: "Процедура связывания с бромуксусной кислотой"; "N-Gly-алкилирование на смоле, способ А"; "Способ А Symphony: процедура связывания со вторичным амином без снятия защиты Fmoc"; "Способ А Symphony: процедура стандартного связывания"; "Способ А Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; "Процедура кэпирования ацетилхлоридом"; "Способ снятия всей защиты А"; "Способ циклизации А". Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 45-85% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 3,4 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 95%, применяя "ЖХ-МС анализ, условия D и E".

ЖХ-МС анализ, условие D: время удерживания=1,95 мин; ESI-MS(+) m/z (M+2H), не определялось.

ЖХ-МС анализ, условие E: время удерживания=1,60 мин; ESI-MS(+) m/z (M+2H), не определялось. ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 942,4667 (M+2H), найдено: 942,4659 (M+2H).

Получение примера 3013

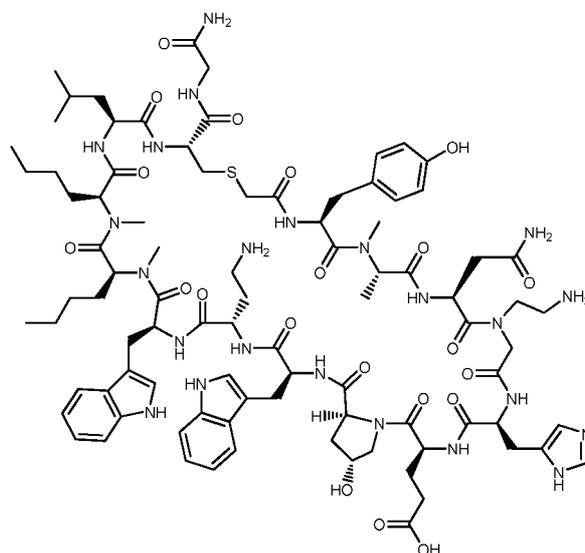


Пример 3013

Пример 3013 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3008, начиная с промежуточной смолы I, используя следующие общие методики: "Процедура связывания с бромуксусной кислотой"; "N-Gly-алкилирование на смоле, способ C"; "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином без снятия защиты Fmoc"; "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания"; "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; "Процедура кэпирования ацетилхлоридом"; "Способ снятия всей защиты A"; "Способ циклизации A". Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 45-85% В на протяжении 40 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 5,8 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 97%, применяя "ЖХ-МС анализ, условия D и E".

ЖХ-МС анализ, условие D: время удерживания=1,80 мин; ESI-MS(+) m/z 942,9 (M+2H); ЖХ-МС анализ, условие D: время удерживания=1,56 мин; ESI-MS(+) m/z 943,0 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 942,4667 (M+2H), найдено: 942,4656 (M+2H).

Получение примера 3014

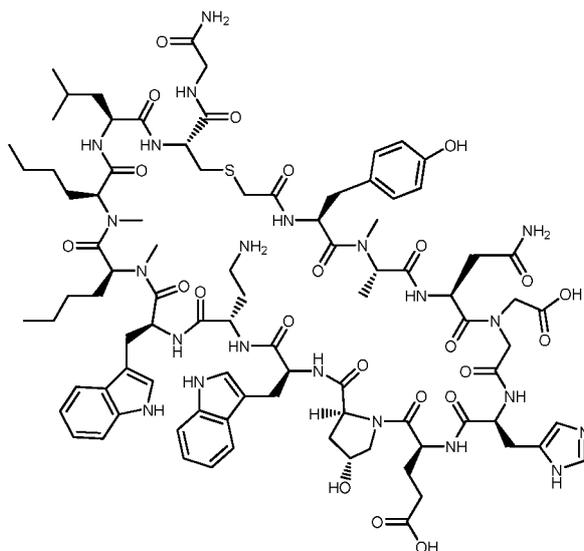


Пример 3014

Пример 3014 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3008, начиная с промежуточной смолы I, используя следующие общие методики: "Процедура связывания с бромуксусной кислотой"; "N-Gly-алкилирование на смоле, способ A"; "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином без снятия защиты Fmoc"; "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания"; "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; "Процедура кэпирования ацетилхлоридом"; "Способ снятия всей защиты A"; "Способ циклизации A". Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 45-85% В на протяжении 40 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 10,2 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 90%, применяя "ЖХ-МС анализ, условие D".

ЖХ-МС анализ, условие D: время удерживания=1,75 мин; ESI-MS(+) m/z 950,5 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 949,9722 (M+2H), найдено: 949,9704 (M+2H).

## Получение примера 3015

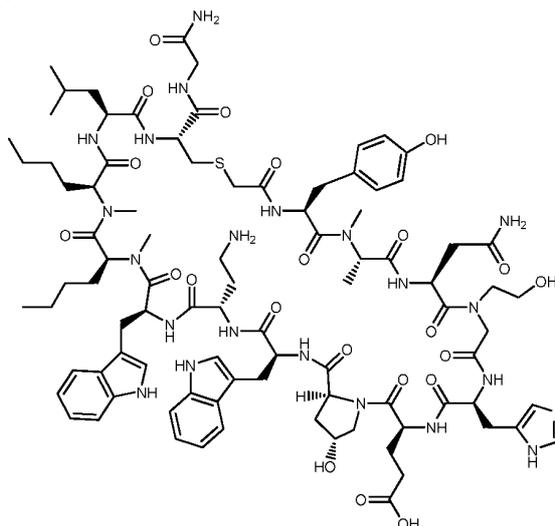


Пример 3015

Пример 3015 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3008, начиная с промежуточной смолы I, используя следующие общие методики: "Процедура связывания с бромуксусной кислотой"; "N-Gly-алкилирование на смоле, способ B"; "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином без снятия защиты Fmoc"; "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания"; "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; "Процедура кэпирования ацетилхлоридом"; "Способ снятия всей защиты A"; "Способ циклизации A". Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза A: 5:95 метанол:вода с 10 mM раствором ацетата аммония; подвижная фаза B: 95:5 метанол:вода с 10 mM раствором ацетата аммония; градиент: 40-80% B на протяжении 40 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% B; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 3,4 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 90%, применяя "ЖХ-МС анализ, условие D".

ЖХ-МС анализ, условие D: время удерживания=1,72 мин; ESI-MS(+) m/z 958,2 (M+2H). ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 957,4538 (M+2H), найдено: 957,4521 (M+2H).

## Получение примера 3016



Пример 3016

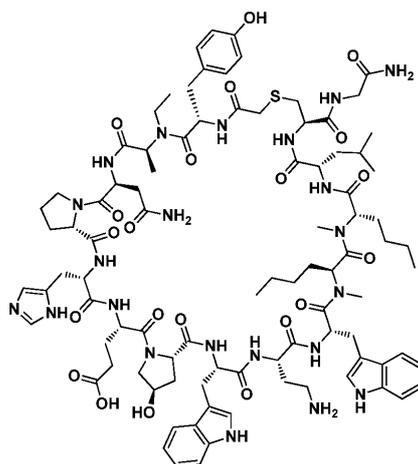
Пример 3016 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3008, начиная с промежуточной смолы I, используя следующие общие методики: "Процедура связывания с бромуксусной кислотой"; "N-Gly-алкилирование на смоле, способ A"; "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином без снятия защиты Fmoc"; "Способ A Symphony: процедура стандартного связывания"; "Способ A Symphony: процедура связывания со вторичным амином"; "Процедура кэпирования ацетилхлоридом"; "Способ снятия всей защиты A"; "Способ циклизации

А". Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 45-85% В на протяжении 35 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 4,0 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 98%, применяя "ЖХ-МС анализ, условия D и E".

ЖХ-МС анализ, условие D: время удерживания=1,85 мин; ESI-MS(+) m/z, (M+2H) не определялось;

ЖХ-МС анализ, условие E: время удерживания=1,56 мин; ESI-MS(+) m/z, (M+2H) не определялось. ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 950,4642 (M+2H) Найдено: 950,4629 (M+2H).

Получение примера 3017



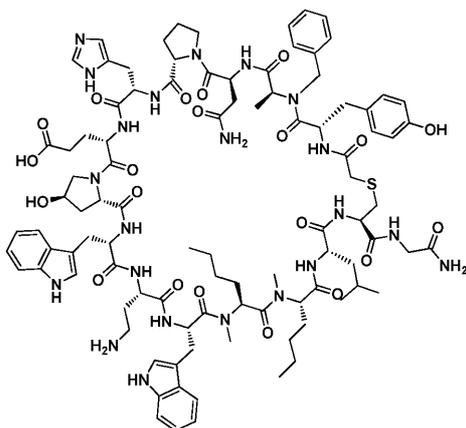
Пример 3017

Пример 3017 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной ниже, начиная с промежуточной смолы E. Следующие процедуры выполнялись последовательно:

"Образование нозилата", "Способ алкилирования В", "Удаление нозилата", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного экпирования", "Способ снятия всей защиты А", и "Способ циклизации А".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 45-85% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Материал дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХ-МС при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 10-50% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 5,1 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 100%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,71 мин; ESI-MS(+) m/z 956,2 (M+2H); ЖХ-МС анализ, условие I: время удерживания=2,73 мин; ESI-MS(+) m/z 956,3 (M+2H).

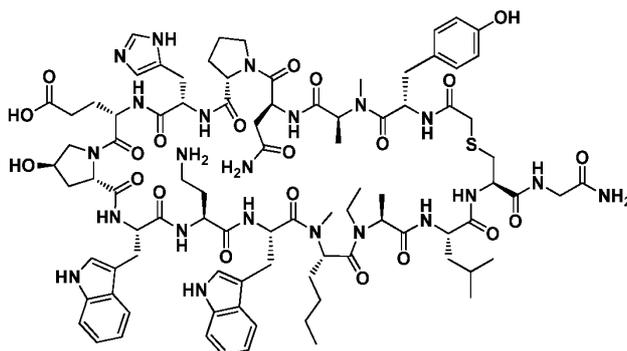
Получение примера 3019



Пример 3019 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, начиная с промежуточной смолы E. Следующие процедуры выполнялись последовательно: "Образование нозилата", "Способ алкилирования A", "Удаление нозилата", "Способ B Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ B Symphony: процедура конечного кэпирования", "Способ снятия всей защиты A", и "Способ циклизации A".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза A: 5:95 метанол:вода с 10 mM раствором ацетата аммония; подвижная фаза B: 95:5 метанол:вода с 10 mM раствором ацетата аммония; градиент: 45-85% B на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% B; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 10,7 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 97%. ЖХ-МС анализ, условие H: время удерживания=1,73 мин; ESI-MS(+) m/z 987,2 (M+2H), ЖХ-МС анализ, условие I: время удерживания=2,81 мин; ESI-MS(+) m/z 987,2 (M+2H).

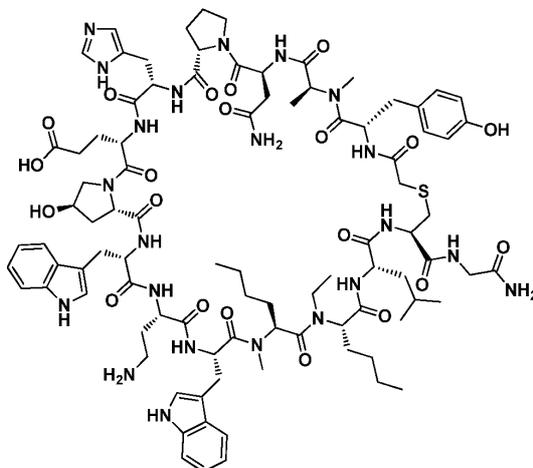
Получение примера 3020



Пример 3020 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, начиная с промежуточной смолы A. Следующие процедуры выполнялись последовательно: "Образование нозилата", "Способ алкилирования B", "Удаление нозилата", "Способ B Symphony: процедура набухания смолы", "Способ B Symphony: процедура стандартного связывания", "Способ B Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ B Symphony: процедура конечного кэпирования", "Способ снятия всей защиты A", и "Способ циклизации A".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM раствором ацетата аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM раствором ацетата аммония; градиент: 10-50% B на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% B; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 14,1 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 97%. ЖХ-МС анализ, условие H: время удерживания=1,5 мин; ESI-MS(+) m/z 935,9 (M+2H). ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,26 мин; ESI-MS(+) m/z 935,0 (M+2H).

Получение примера 3021



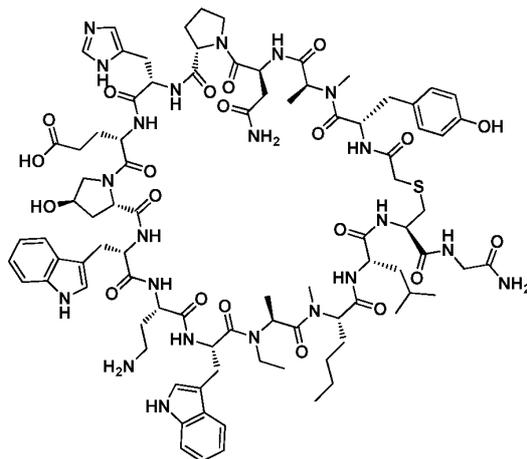
Пример 3021 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, начиная с промежуточной смолы B. Следующие процедуры выполнялись последовательно: "Образование нозилата", "Способ алкилирования B", "Удаление нозилата", "Способ B Symphony: процедура набухания смолы", "Способ B Symphony: процедура стандартного связывания", "Спо-



соб В Symphony: процедура связывания со вторичным амином", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного экпирования", "Способ снятия всей защиты А", и "Способ циклизации А".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 10-50% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 6,9 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 98%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,67 мин; ESI-MS(+) m/z 955,9 (M+2H). ЖХ-МС анализ, условие I: время удерживания=2,73 мин; ESI-MS(+) m/z 956,2 (M+2H).

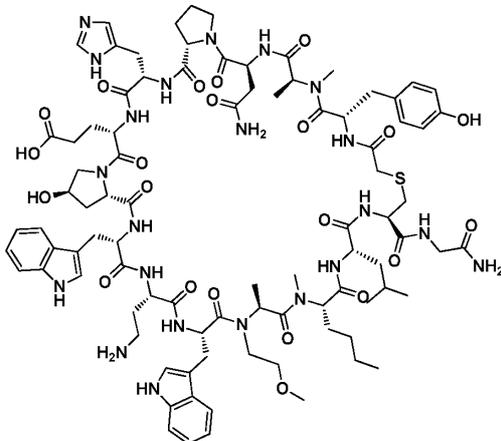
Получение примера 3024



Пример 3024 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, начиная с промежуточной смолы D. Следующие процедуры выполнялись последовательно: "Образование нозилата", "Способ алкилирования В", "Удаление нозилата", "Способ В Symphony: процедура набухания смолы", "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания", "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного экпирования", "Способ снятия всей защиты А", и "Способ циклизации А".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 10-50% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 9,2 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 100%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,59 мин; ESI-MS(+) m/z 935,0 (M+2H). ЖХ-МС анализ, условие Е: время удерживания=1,38 мин; ESI-MS(+) m/z 935,3 (M+2H).

Получение примера 3025

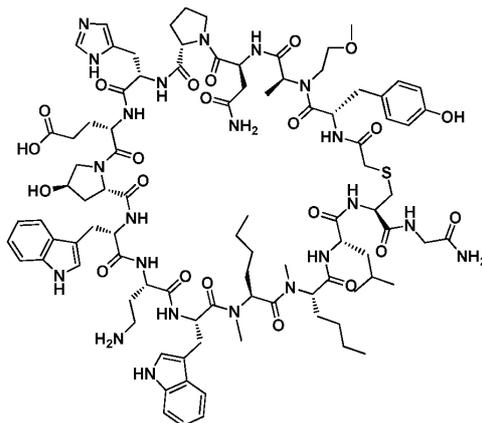


Пример 3025 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, начиная с промежуточной смолы D. Следующие процедуры выполнялись последовательно: "Образование нозилата", "Способ алкилирования А", "Удаление нозилата", "Способ В Symphony: процедура набухания смолы", "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания", "Спо-

соб В Symphony: процедура связывания со вторичным амином", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного кэпирования", "Способ снятия всей защиты А", и "Способ циклизации А".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 10-50% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 8,0 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 95%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,5 мин; ESI-MS(+) m/z 950,0 (M+2H). ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,37 мин; ESI-MS(+) m/z 949,6 (M+2H).

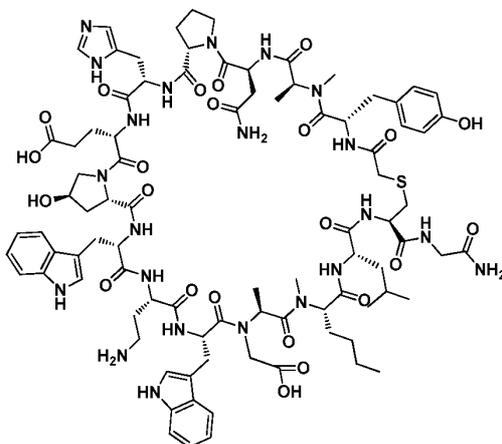
Получение примера 3026



Пример 3026 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, начиная с промежуточной смолы Е. Следующие процедуры выполнялись последовательно: "Образование нозилата", "Способ алкилирования А", "Удаление нозилата", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного кэпирования", "Способ снятия всей защиты А", и "Способ циклизации А".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 10-50% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Материал дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХ-МС при следующих условиях: колонка: Waters CSH C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 5-45% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 10,8 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 78%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,74 мин; ESI-MS(+) m/z 971,1 (M+2H). ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,37 мин; ESI-MS(+) m/z 971,1 (M+2H).

Получение примера 3028

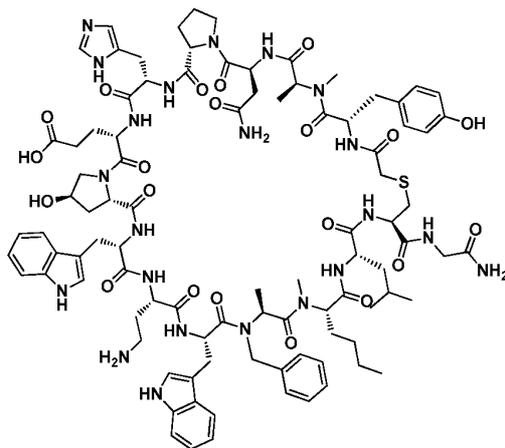


Пример 3028 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, начиная с промежуточной смолы D. Следующие процедуры выполнялись последо-

вательно: "Образование нозилата", "Способ алкилирования В", "Удаление нозилата", "Способ В Symphony: процедура набухания смолы", "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания", "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного экипирования", "Способ снятия всей защиты А", и "Способ циклизации А".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 5-45% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 4,1 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 82%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,31 мин; ESI-MS(+) m/z 950,0 (M+2H). ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,16 мин; ESI-MS(+) m/z 950,0 (M+2H).

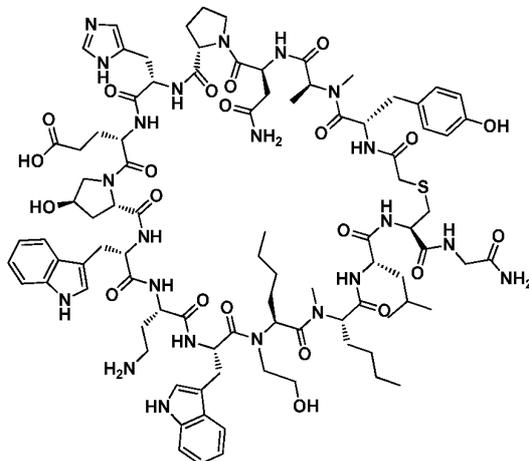
Получение примера 3029



Пример 3029 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, начиная с промежуточной смолы D. Следующие процедуры выполнялись последовательно: "Образование нозилата", "Способ алкилирования А", "Удаление нозилата", "Способ В Symphony: процедура набухания смолы", "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания", "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного экипирования", "Способ снятия всей защиты А", и "Способ циклизации А".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 50-90% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 2,7 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 78%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,97 мин; ESI-MS(+) m/z 967,7 (M+2H). ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,53 мин; ESI-MS(-) m/z 965,5 (M+2H).

Получение примера 3030

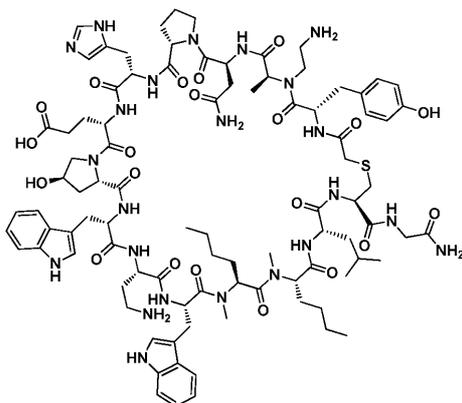


Пример 3030 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для полу-

чения примера 3017, начиная с промежуточной смолы С. Следующие процедуры выполнялись последовательно: "Образование нозилата", "Способ алкилирования А", "Удаление нозилата", "Способ В Symphony: процедура набухания смолы", "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания", "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного кэпирования", "Способ снятия всей защиты А", и "Способ циклизации А".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 10-50% В на протяжении 40 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 3,0 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 86%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,59 мин; ESI-MS(+) m/z 964,3 (M+2H). ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,27 мин; ESI-MS(+) m/z 964,3 (M+2H).

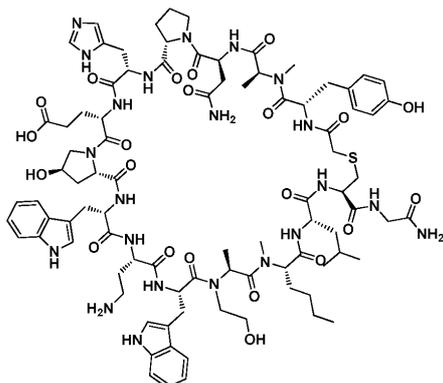
Получение примера 3032



Пример 3032 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, начиная с промежуточной смолы Е. Следующие процедуры выполнялись последовательно: "Образование нозилата", "Способ алкилирования А", "Удаление нозилата", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного кэпирования", "Способ снятия всей защиты А", и "Способ циклизации А".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 10-50% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Материал дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХ-МС при следующих условиях: колонка: Waters CSH C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 0-40% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 4,6 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 98%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,69 мин; ESI-MS(+) m/z 963,4 (M+2H). ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,14 мин; ESI-MS(+) m/z 964,2 (M+2H).

Получение примера 3033

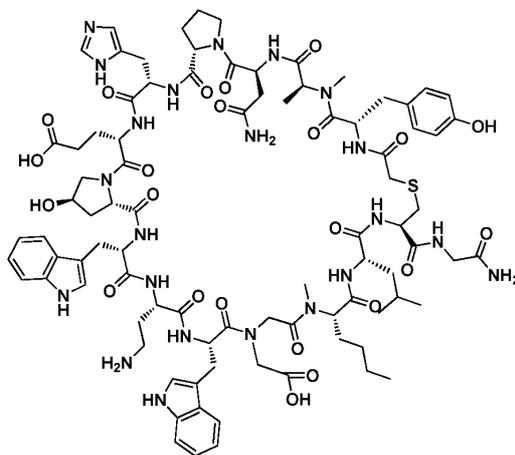


Пример 3033 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для полу-

чения примера 3017, начиная с промежуточной смолы D. Следующие процедуры выполнялись последовательно: "Образование нозилата", "Способ алкилирования А", "Удаление нозилата", "Способ В Symphony: процедура набухания смолы", "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания", "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного экипирования", "Способ снятия всей защиты А", и "Способ циклизации А".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 5-45% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Материал дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХ-МС при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 25-70% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 0,6 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 85%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,42 мин; ESI-MS(+) m/z 943,0 (M+2H). ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,13 мин; ESI-MS(+) m/z 1883,9 (M+H).

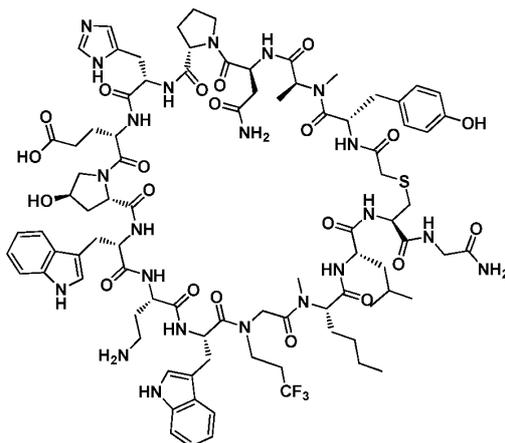
Получение примера 3037



Пример 3037 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, начиная с промежуточной смолы F. Следующие процедуры выполнялись последовательно: "N-Gly-алкилирование на смоле, способ D", "Способ В Symphony: процедура набухания смолы", "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания", "Способ В Symphony: процедура связывания со вторичным амином", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного экипирования", "Способ снятия всей защиты А", и "Способ циклизации А".

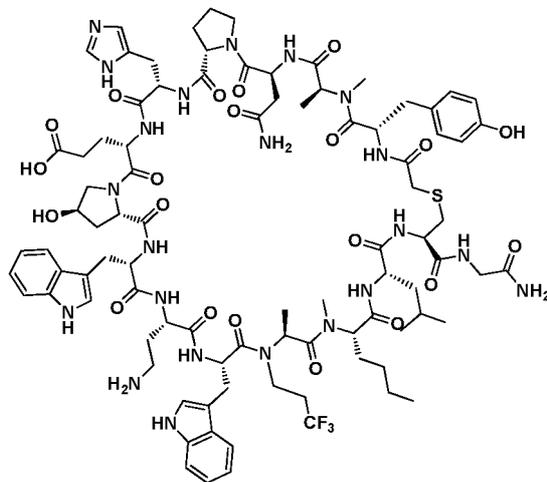
Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 0-40% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 32,0 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 94%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,25 мин; ESI-MS(+) m/z 943,2 (M+2H); ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,14 мин; ESI-MS(+) m/z 943,2 (M+2H).

## Получение примера 3038



Пример 3038 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, состоящей из следующих общих методик, начиная с промежуточной смолы F: "N-Gly-алкилирование на смоле, способ D", "Способ B Symphony: процедура набухания смолы", "Способ B Symphony: процедура стандартного связывания", "Способ B Symphony: процедура связывания со вторичным амином", "Способ B Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ B Symphony: процедура конечного кэпирования", "Способ снятия всей защиты A", и "Способ циклизации A". Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 10-50% B на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% B; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 11,9 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 95%. ЖХ-МС анализ, условие H: время удерживания=1,64 мин; ESI-MS(+) m/z 962,1 (M+2H); ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,33 мин; ESI-MS(+) m/z 962,0 (M+2H).

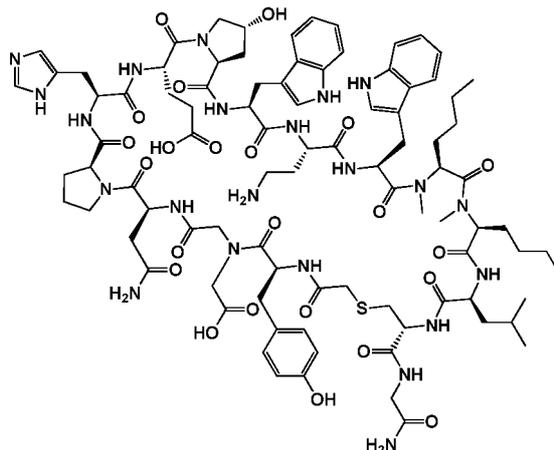
## Получение примера 3041



Пример 3041 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, состоящей из следующих общих методик, начиная с промежуточной смолы D: "Образование нозилата", "Способ алкилирования A", "Удаление нозилата", "Способ B Symphony: процедура набухания смолы", "Способ B Symphony: процедура стандартного связывания", "Способ B Symphony: процедура связывания со вторичным амином", "Способ B Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ B Symphony: процедура конечного кэпирования", "Способ снятия всей защиты A", и "Способ циклизации A".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 10-50% B на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% B; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 3,8 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 81%. ЖХ-МС анализ, условие H: время удерживания=1,68 мин; ESI-MS(+) m/z 970,0 (M+2H); ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,51 мин; ESI-MS(+) m/z 969,3 (M+2H).

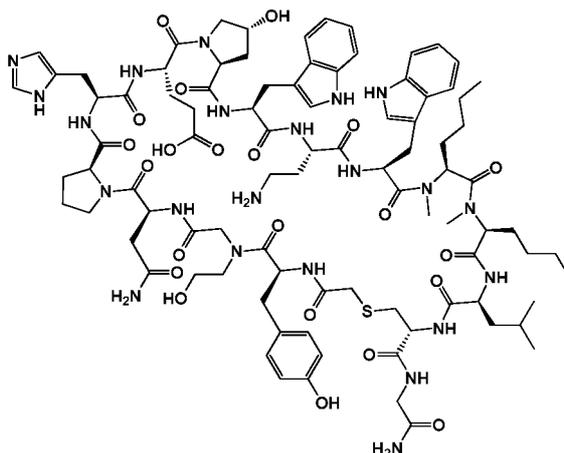
## Получение примера 3044



Пример 3044 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 0001, состоящей из следующих общих методик, начиная с промежуточной смолы G: "N-Gly-алкилирование на смоле, способ D", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного экпирования", "Способ снятия всей защиты А" и "Способ циклизации А".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: Waters CSH C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 10-50% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Материал дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХ-МС при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 10-50% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 19,4 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 96%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,55 мин; ESI-MS(+) m/z 964,1 (M+2H); ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,32 мин; ESI-MS(+) m/z 963,8 (M+2H).

## Получение примера 3045

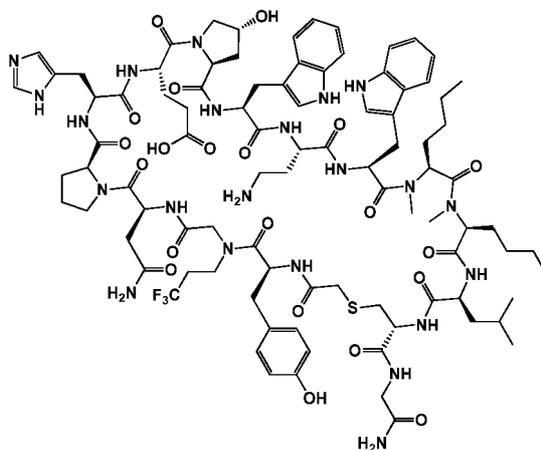


Пример 3045 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, состоящей из следующих общих методик, начиная с промежуточной смолы G: "N-Gly-алкилирование на смоле, способ D", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного экпирования", "Способ снятия всей защиты А", и "Способ циклизации А".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 15-55% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Материал дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХ-МС при следующих условиях: колонка: XBridge

C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 5-45% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 1,5 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 94%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,60 мин; ESI-MS(+) m/z: 957,1 (M+2H); ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,30 мин; ESI-MS(+) m/z 957,5 (M+2H).

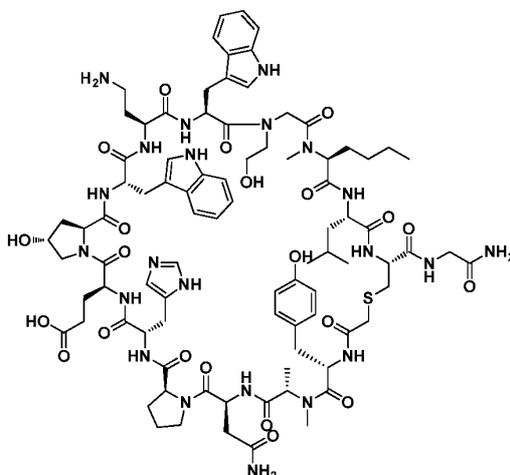
Получение примера 3046



Пример 3046 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, состоящей из следующих общих методик, начиная с промежуточной смолы G: "N-Gly-алкилирование на смоле, способ D", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного экзипирования", "Способ снятия всей защиты А", и "Способ циклизации А".

Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 10-50% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Материал дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХ-МС при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 10-50% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 7,2 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 100%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,71 мин; ESI-MS(+) m/z 982,9 (M+2H). ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,40 мин; ESI-MS(+) m/z 982,9 (M+2H).

Получение примера 3047



Пример 3047 получали в соответствии с общей последовательностью синтеза, описанной для получения примера 3017, состоящей из следующих общих методик, начиная с промежуточной смолы F: "N-Gly-алкилирование на смоле, способ D", "Способ В Symphony: процедура набухания смолы", "Способ В Symphony: процедура стандартного связывания", "Способ В Symphony: процедура связывания со вто-

ричным амином", "Способ В Symphony: процедура связывания выбранных аминокислот", "Способ В Symphony: процедура конечного экпирования", "Способ снятия всей защиты А", и "Способ циклизации А". Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 40-80% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Материал дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХ-МС при следующих условиях: колонка: Waters CSH C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 5-45% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 1,0 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 97%. ЖХ-МС анализ, условие Н: время удерживания=1,44 мин; ESI-MS(+) m/z 936,1 (M+2H); ЖХ-МС анализ, условие J: время удерживания=1,21 мин; ESI-MS(+) m/z 936,4 (M+2H).

Экспериментальные методики для соединений 5001, 5002, 5003.

Аналитические данные.

Масс-спектрометрия: "ESI-MS(+)" означает масс-спектрометрию с электрораспылительной ионизацией, выполненную в режиме регистрации положительных ионов; "ESI-MS(-)" означает масс-спектрометрию с электрораспылительной ионизацией, выполненную в режиме регистрации отрицательных ионов; "ESI-HRMS(+)" означает жидкостную хроматомасс-спектрометрию с электрораспылительной ионизацией, выполненную в режиме регистрации положительных ионов; "ESI-HRMS(-)" означает жидкостную хроматомасс-спектрометрию с электрораспылительной ионизацией, выполненную в режиме регистрации отрицательных ионов. Установленные значения массы приводятся после обозначения единицы измерения "m/z". Соединения с точными массами более 1000 часто детектировались в виде двухзарядных или трехзарядных ионов.

Аналитическое условие А:

колонка: Waters VEN C18, 2,0×50 мм, 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; температура: 50°C; градиент: 0% В, 0-100% В на протяжении 3 мин, затем 0,5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 1 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм.

Аналитическое условие В:

колонка: Waters VEN C18, 2,0×50 мм, 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; температура: 50°C; градиент: 0% В, 0-100% В на протяжении 3 мин, затем 0,5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 0,5 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм.

Аналитическое условие С:

колонка: Waters Aquity VEN C18×50 мм, 1,7 мкм; подвижная фаза А: вода с 0,05% TFA; подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,05% TFA; температура: 40°C; градиент: 0% В, 0-100% В на протяжении 1,5 мин, затем 0,5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 0,8 мл/мин; детектирование: УФ при 220 нм.

Общие методики.

Способ А "Prelude".

Все манипуляции выполнялись автоматически на синтезаторе пептидов Prelude (Protein Technologies). Все методики, если не указано иное, выполнялись в 10 мл полипропиленовой пробирке, оснащенной нижней фриттой, когда объем реакции превышал 0,100 ммоль, использовалась 40 мл полипропиленовая пробирка, оснащенная нижней фриттой. Пробирка соединяется с синтезатором пептидов Prelude как через дно, так и через верхнюю часть пробирки. DMF и DCM могут быть добавлены через верх пробирки, что позволяет равномерно омывать ее боковые стороны. Остальные реагенты добавляли через нижнюю часть пробирки и пропускали через фритту для контакта со смолой. Все растворы удалялись через дно пробирки. "Периодическое перемешивание" описывает короткий импульс газообразного N<sub>2</sub> через нижнюю фритту; импульс длится примерно 5 с и происходит каждые 30 с. Растворы хлорацетилхлорида в DMF использовали в течение 24 ч после приготовления. Растворы аминокислот обычно не использовались более трех недель после приготовления. Растворы НАТУ использовали в течение 5 дней после приготовления. DMF=диметилформамид; НАТУ=1-[бис(диметиламино)метил]-1Н-1,2,3-триазол[4,5-*b*]пиридины 3-оксидгексафторфосфат; DIPEA=диизопропилэтиламин; смола Ринка=(2,4-диметоксифенил)(4-алкоксифенил)метанамин, где "4-алкокси" описывает положение и тип соединения с полистирольной смолой. Используемая смола представляет собой полимер Меррифилда (полистирол) с линкером Ринка (Fmoc-защищенный на азоте); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,56 ммоль/г. Используемые типичные аминокислоты с защитными группами боковой цепи, указанными в скобках, перечислены ниже. 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)-

ОН; Fmoc-Hyp(tBu)-ОН; Fmoc-Ile-ОН; Fmoc-Leu-ОН; Fmoc-Lys(Boc)-ОН; Fmoc-Nle-ОН; Fmoc-Met-ОН; Fmoc-[N-Me]Ala-ОН; Fmoc-[N-Me]Nle-ОН; Fmoc-Phe-ОН; Fmoc-Pro-ОН; Fmoc-Sar-ОН; Fmoc-Ser(tBu)-ОН; Fmoc-Thr(tBu)-ОН; Fmoc-Trp(Boc)-ОН; Fmoc-Tyr(tBu)-ОН; Fmoc-Val-ОН.

Процедуры "способа A Prelude" описывают эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяется количеством линкера Ринка, связанного со смолой. Эта шкала соответствует приблизительно 178 мг смолы Ринка-Меррифилда, описанной выше. Все процедуры можно масштабировать за пределы шкалы 0,100 ммоль, отрегулировав описанные объемы кратно масштабу. Перед аминокислотным связыванием все последовательности синтеза пептидов начинались с процедуры набухания смолы, описанной ниже, как "Процедура набухания смолы". В связывании аминокислот с N-концом первичного амина применяли "Процедуру одиночного связывания", описанную ниже. При связывании аминокислот с N-концом вторичного амина применяли "Процедуру двойного связывания", описанную ниже. Связывание хлорацетилхлорида с N-концом пептида описано "Процедурой связывания с хлорацетилхлоридом", представленной ниже.

Процедура набухания смолы.

В 10 мл полипропиленовый твердофазный реакционный сосуд добавляли Меррифилд:смолу Ринка (178 мг, 0,100 ммоль). Смолу промывали (проводили набухание) три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,0 мл), после чего смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, затем растворитель сливали через фритту.

Процедура одиночного связывания.

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 мин и затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали 6 раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,0 мл) через верх сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, затем раствор сливали 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 конце, DIPEA (0,8 М в DMF, 0,5 мл, 4 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали четыре раза следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,0 мл) через верх сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли уксусный ангидрид (2,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали четыре раза следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,0 мл) через верх сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 90 с, затем раствор сливали через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Процедура двойного связывания.

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

Процедура связывания с хлорацетилхлоридом.

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 мин и затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно

шесть раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,0 мл) через верх сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 30 с, и затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли DIPEA (0,8 М в DMF, 3,0 мл, 24 экв.), затем хлорацетилхлорид (0,8 М в DMF, 1,65 мл, 13,2 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 30 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали три раза следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (2,0 мл) через верх сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 90 с, затем раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали четыре раза следующим образом: для каждой промывки добавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2,0 мл) через верх сосуда, и полученную в результате смесь периодически перемешивали в течение 90 с, затем раствор сливали через фритту. Полученную смолу помещали в поток  $\text{N}_2$  на 15 мин.

Способ А "Symphony".

Этот набор процедур идентичен описанным в "Способе А Prelude", за исключением отмеченных случаев. Для всех процедур вместо синтезатора пептидов Prelude использовался синтезатор пептидов Symphony X (Protein Technologies), и все реагенты добавлялись через верх реакционного сосуда.

Процедура набухания смолы.

Эта процедура идентична процедуре "Способ А Prelude: процедура набухания смолы".

Процедура одиночного связывания.

Эта процедура идентична процедуре "Способ А Prelude: процедура одиночного связывания", за исключением того, что концентрация раствора DIPEA составляла 0,4 М, и 1,0 мл этого раствора добавляли в реакцию.

Процедура двойного связывания.

Эта процедура идентична процедуре "Способ А Prelude: процедура двойного связывания", за исключением того, что концентрация раствора DIPEA составляла 0,4 М, и 1,0 мл этого раствора добавляли в реакцию.

Процедура связывания с хлорацетилхлоридом:

Эта процедура идентична процедуре "Способ А Prelude: процедура связывания с хлорацетилхлоридом".

Способ снятия всей защиты А.

Все манипуляции выполнялись вручную, если не указано иное. Методика "Способ снятия всей защиты А" описывает эксперимент, выполненный в пределах 0,100 ммоль, где загрузка определяется количеством линкера Ринка, связанного со смолой. Процедуру можно масштабировать за пределами шкалы 0,100 ммоль, отрегулировав описанные объемы кратными пределу. "Раствор для снятия защиты" получали путем соединения в 40 мл стеклянной вialsе 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 4 мл стеклянную вialsу. В вialsу добавляли "раствор для снятия защиты" (2,0 мл). Смесь интенсивно перемешивали в шейкере (1000 об/мин в течение 1 мин, затем 500 об/мин в течение 1-2 ч). Смесь фильтровали через 0,2-микронный фильтр-шприц, и твердые вещества экстрагировали "раствором для снятия защиты" (1,0 мл) или TFA (1,0 мл). В 24 мл пробирку, заполненную объединенными фильтрами, добавляли  $\text{Et}_2\text{O}$  (15 мл). Смесь интенсивно перемешивали, после чего осаждалось значительное количество белого твердого вещества. Смесь центрифугировали в течение 5 мин, затем раствор сливали с твердых веществ и отстаивали. Твердые вещества суспендировали в  $\text{Et}_2\text{O}$  (20 мл); затем смесь центрифугировали в течение 5 мин; и раствор сливали с твердых веществ и отстаивали. В последний раз твердые вещества суспендировали в  $\text{Et}_2\text{O}$  (20 мл); смесь центрифугировали в течение 5 мин; и раствор сливали с твердых веществ и отстаивали с получением неочищенного пептида в виде от белого до не совсем белого твердого вещества.

Способ циклизации А.

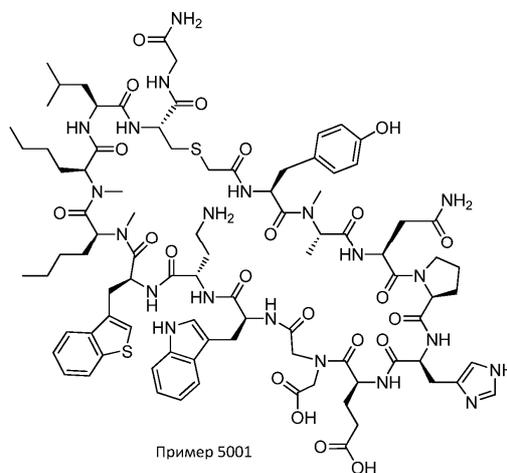
Все манипуляции выполнялись вручную, если не указано иное. Методика "Способ циклизации В" описывает эксперимент, выполненный в пределах 0,100 ммоль, где предел определяется количеством линкера Ринка, связанного со смолой, используемой для образования пептида. Эта шкала не основана на прямом определении количества пептида, используемого в способе. Процедуру можно масштабировать за пределами шкалы 0,100 ммоль, отрегулировав описанные объемы кратными пределу. Неочищенные твердые пептиды растворяли в MeCN:водн. 0,1 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (1:1) к общему объему 18-22 мл, и затем раствор осторожно доводили до pH 8,5-9,0, применяя водный NaOH (1,0 М). Раствор затем оставляли стоять без перемешивания в течение 6 дней. Реакционный раствор концентрировали, и затем остаток растворяли в DMSO:MeOH. Этот раствор подвергали очистке путем обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением целевого циклического пептида.

Общая последовательность синтеза А.

"Общая последовательность синтеза А" описывает общую последовательность процедур, которые использовались для получения описанных в настоящем документе циклических пептидов. Для этих общих целей процедуры "Способа А Symphony" взаимозаменяемы с процедурами "Способа А Prelude". В 10 мл полипропиленовый твердофазный реакционный сосуд помещали смолу Ринка-Меррифида (178 мг, 0,100 ммоль) и реакционный сосуд помещали в пептидный синтезатор Prelude. Проводили про-

цедуру "Способ A Prelude: набухание смолы", затем последовательно проводили серии связываний аминокислот на Prelude, следуя "Способу A Prelude: процедура одиночного связывания", если N-конец связанного со смолой пептида являлся первичным амином, или "Способу A Prelude: процедура двойного связывания", если N-конец связанного со смолой пептида являлся вторичным амином. Проводили процедуры "Способ A Prelude: процедура связывания с хлорацетилхлоридом"; затем "Способ снятия всей защиты A"; затем "Способ циклизации A".

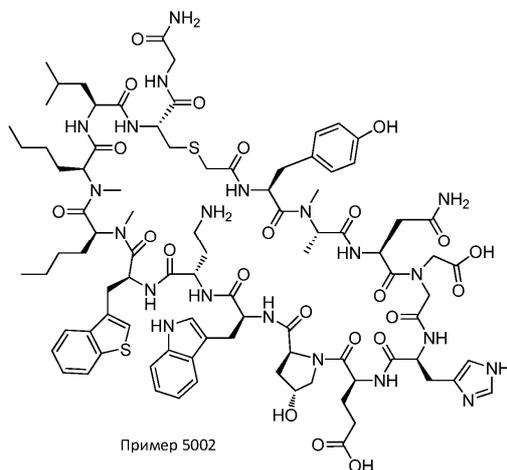
Получение примера 5001



Пример 5001 получали, следуя "Общей последовательности синтеза A". В синтезе использовалась 2-(((9Н-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)аминоуксусная кислота, как указано в последовательности. Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 50-90% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 7,8 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 100%.

Аналитическое условие А: время удерживания=1,48 мин; ESI-MS(+) m/z 956,81 (M-2H), аналитическое условие В: время удерживания=2,82 мин; ESI-MS(+) m/z 958,2 (M+2H).

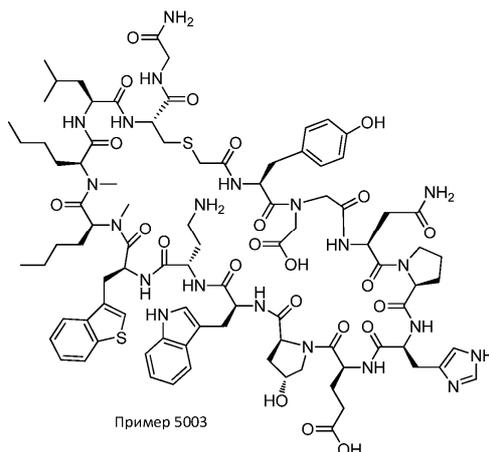
Получение примера 5002



Пример 5002 получали, следуя "Общей последовательности синтеза A". В синтезе использовалась 2-(((9Н-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)аминоуксусная кислота, как указано в последовательности. Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 55-95% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 2,2 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 81%.

Аналитическое условие А: время удерживания=1,51 мин; ESI-MS(+) m/z 964,1 (M-2H), аналитическое условие В: время удерживания=2,88 мин; ESI-MS(+) m/z 966,5 (M+2H).

## Получение примера 5003



Пример 5003 получали, следуя "Общей последовательности синтеза А". В синтезе использовалась 2-(((9Н-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)аминоуксусная кислота, как указано в последовательности. Сырой материал очищали путем препаративной ЖХ-МС в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 60-100% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Материал дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХ-МС при следующих условиях: колонка: XBridge Phenyl, 19×200 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ раствором ацетата аммония; градиент: 5-40% В на протяжении 30 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% В; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и высушивали путем центробежного выпаривания. Выход продукта составил 4,0 мг, и его чистота, установленная с помощью ЖХ-МС-анализа, составила 100%.

Аналитическое условие А: время удерживания=1,777 мин; ESI-MS(+) m/z 972,40 (M+2H), аналитическое условие В: время удерживания=2,393 мин; ESI-MS(+) m/z 968,25 (M-2H). ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 971,9344 (M+2H). Найдено: 971,9311 (M+2H).

#### Способы исследования способности макроциклических пептидов конкурировать за связывание PD-1 с PD-L1 с использованием анализов связывания методом гомогенной разрешенной во времени флуоресценции (HTRF)

Способность макроциклических пептидов по настоящему изобретению связываться с PD-L1 была исследована с помощью PD-1/PD-L1 анализа связывания методом гомогенной разрешенной во времени флуоресценции (HTRF).

##### Способы.

Анализ связывания методом гомогенной разрешенной во времени флуоресценции (HTRF) растворимого PD-1 с растворимым PD-L1. Растворимый PD-1 и растворимый PD-L1 относятся к белкам с укорочениями карбоксильного конца, которые исключают трансмембранные спиральные области и слиты с гетерологичными последовательностями, в частности, частью Fc последовательности человеческого иммуноглобулина G (Ig) или метки гексагистидинового эпитопа (His). Все анализы связывания проводили в буфере для анализа HTRF, состоящем из dPBS, дополненном 0,1% (мас./об.) бычьим сывороточным альбумином и 0,05% (об./об.) Твин-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 человека, яванского макака, мыши или других видов. Обнаружение HTRF достигали с использованием меченого криптомом европия анти-Ig моноклонального антитела (конечная концентрация 1 нМ) и меченого аллофикоцианином (APC) анти-His моноклонального антитела (конечная концентрация 20 нМ). Антитела разводили в буфере для обнаружения HTRF и 5 мкл распределяли поверх реакции связывания. Реакционную смесь оставляли для уравнивания в течение 30 мин, и сигнал (отношение 665 нм/620 нм) получали с использованием флюориметра EnVision. Были установлены 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 и 5 нМ соответственно). Исследования связывания/конкуренции между биотинилированным соединением № 71 и человеческим PD-L1-His выполнялись следующим образом. Макроциклические пептидные ингибиторы 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. Связыванию давали урав-

новеситься в течение 30 мин с последующим добавлением меченого криплатом европия стрептавидина (конечная концентрация 2,5 пМ) и APC-меченого анти-His (конечная концентрация 20 нМ) в 5 мкл буфера HTRF. Реакции давали уравниваться в течение 30 мин, и сигнал (отношение 665 нм/620 нм) получали с использованием флуориметра EnVision.

Рекомбинантные белки. Карбоксил-укороченный человеческий PD-1 (аминокислоты 25-167) с С-концевой меткой эпитопа Ig человека [hPD-1(25-167)-3S-Ig] и PD-L1 человека (аминокислоты 18-239) с С-концевой меткой эпитопа His человека [hPD-L1(19-239)-сайт расщепления протеазы вируса прижикловой крапчатости табака (TVMV)-His] экспрессировали в клетках HEK293Т и последовательно очищали аффинной хроматографией с рекомбинантным белком А и эксклюзионной хроматографией. Человеческие PD-L2-His (Sino Biologicals), CD80-His (Sino Biologicals), CTLA4-Ig (RnD Systems) все были получены из коммерческих источников.

Последовательность рекомбинантного PD-1-Ig человека

**hPD1(25-167)-3S-Ig**

```

1      LDS PDR P W N P   P T F S P A L L V V   T E G D N A T F T C   S F S N T S E S F V   L N W Y R M S P S N
51     Q T D K L A A F P E   D R S Q P G Q D C R   F R V T Q L P N G R   D F H M S V V R A R   R N D S G T Y L C G
101    A I S L A P K A Q I   K E S L R A E L R V   T E R R A E V P T A   H P S P S P R P A G   Q F Q G S P G G G G
151    G R E P K S S D K T   H T S P P S P A P E   L L G G S S V F L F   P P K P K D T L M I   S R T P E V T C V V
201    V D V S H E D P E V   K F N W Y V D G V E   V H N A K T K P R E   E Q Y N S T Y R V V   S V L T V L H Q D W
251    L N G K E Y K C K V   S N K A L P A P I E   K T I S K A K G Q P   R E P Q V Y T L P P   S R D E L T K N Q V
301    S L T C L V K G F Y   P S D I A V E W E S   N G Q P E N N Y K T   T P P V L D S D G S   F F L Y S K L T V D
351    K S R W Q Q G N V F   S C S V M H E A L H   N H Y T Q K S L S L   S P G K

```

(SEQ ID NO: 1).

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

**hPDL1(19-239)-TVMV-His**

```

1      F T V T V P K D L Y   V V E Y G S N M T I   E C K F P V E K Q L   D L A A L I V Y W E   M E D K N I I Q F V
51     H G E E D L K V Q H   S S Y R Q R A R L L   K D Q L S L G N A A   L Q I T D V K L Q D   A G V Y R C M I S Y
101    G G A D Y K R I T V   K V N A P Y N K I N   Q R I L V V D P V T   S E H E L T C Q A E   G Y P K A E V I W T
151    S S D H Q V L S G K   T T T T N S K R E E   K L F N V T S T L R   I N T T T N E I F Y   C T F R R L D P E E
201    N H T A E L V I P E   L P L A H P P N E R   T G S S E T V R F Q   G H N H H H H

```

(SEQ ID NO: 2).

Результаты представлены в таблице. Как показано, макроциклические пептиды по настоящему изобретению продемонстрировали сильное ингибирование активности связывания PD-1-Ig с PD-L1-TVMV-His (PD-L1-His). Результаты представлены в следующих диапазонах: А=0,10-10 мкМ; В=0,01-0,099 мкМ; С=0,005-0,0099 мкМ.

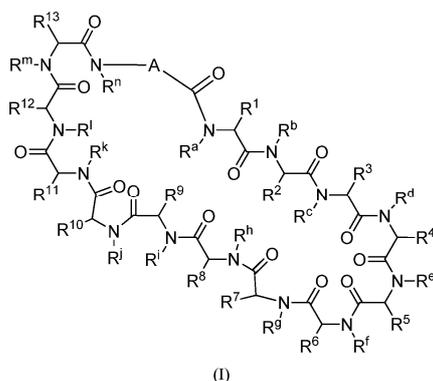
| Номер Примера | HTRF IC50 (мкМ) |
|---------------|-----------------|
| 3003          | В               |
| 3004          | В               |
| 3005          | 0.03            |
| 3006          | В               |
| 3007          | В               |
| 3008          | 0.20            |
| 3009          | В               |
| 3010          | В               |
| 3011          | 6.12E-03        |
| 3012          | В               |
| 3013          | В               |
| 3014          | В               |
| 3015          | В               |
| 3016          | В               |
| 3017          | С               |
| 3019          | В               |
| 3020          | С               |
| 3021          | С               |
| 3022          | В               |
| 3023          | В               |

|      |      |
|------|------|
| 3024 | B    |
| 3025 | B    |
| 3026 | B    |
| 3028 | A    |
| 3029 | A    |
| 3030 | B    |
| 3032 | B    |
| 3033 | A    |
| 3037 | A    |
| 3038 | 2.36 |
| 3041 | B    |
| 3044 | B    |
| 3045 | B    |
| 3046 | B    |
| 3047 | --   |
| 3048 | A    |
| 3049 | A    |
| 3050 | A    |
| 5001 | C    |
| 5002 | C    |
| 5003 | B    |

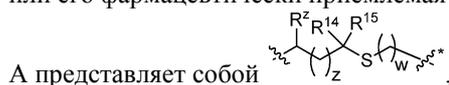
Специалисту в данной области техники будет очевидно, что настоящее изобретение не ограничивается приведенными выше иллюстративными примерами и может быть воплощено в других конкретных формах, не отступая от его основных характеристик. Поэтому желательно, чтобы примеры рассматривались во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничительные, при этом приводится ссылка на прилагаемую формулу изобретения, а не на приведенные выше примеры, и все изменения, которые входят в значения и диапазон эквивалентности формулы изобретения, таким образом охватываются ей.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

#### 1. Соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль, где



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

z имеет значение 0;

w имеет значение 1;

R<sup>14</sup> и R<sup>15</sup> представляют собой водород;

R<sup>z</sup> представляет собой -C(O)NHR<sup>16</sup>, где R<sup>16</sup> представляет собой -CHR<sup>17</sup>C(O)NH<sub>2</sub>, где R<sup>17</sup> представляет собой водород;

R<sup>1</sup> представляет собой бензил, необязательно замещенный гидроксигруппой;

R<sup>2</sup> представляет собой водород или метил;

R<sup>3</sup> представляет собой CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>;

$R^4$  представляет собой H;

$R^5$  представляет собой  $\text{CH}_2$ -имидазолил;

$R^6$  представляет собой  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ;

$R^7$  представляет собой H или этил;

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

$R^9$  представляет собой  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ;

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

$R^{11}$  представляет собой бутил;

$R^{12}$  представляет собой бутил;

$R^{13}$  представляет собой изобутил;

$R^c$ ,  $R^f$ ,  $R^h$ ,  $R^i$  и  $R^m$  представляют собой водород;

$R^n$  представляет собой водород или метил;

$R^a$  представляет собой водород или метил;

$R^j$  представляет собой водород;

$R^2$ ,  $R^4$ ,  $R^7$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$  могут, каждый независимо, образовывать кольцо с соответствующей вицинальной R группой, как описано ниже;

$R^b$  выбран из  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкокси- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, карбокси- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, гало- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, гидрокси- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила,  $(\text{NR}^a\text{R}^b)\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, где  $R^a$  и  $R^b$  независимо выбраны из водорода и  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила; и фенил- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, где указанный фенил необязательно замещен одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкокси,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, циано, галогена и нитро; или  $R^b$  и  $R^2$  совместно с атомами, к которым они присоединены, образуют кольцо, выбранное из азетидина, пирролидина, морфолина, пиперидина, пиперазина и тетрагидротиазола; где каждое кольцо необязательно замещено от одной до четырех группами, независимо выбранными из amino, циано, метила, галогена и гидрокси;

$R^d$  выбран из водорода,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкокси- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, карбокси- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, гало- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, гидрокси- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила,  $(\text{NR}^a\text{R}^b)\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, где  $R^a$  и  $R^b$  независимо выбраны из водорода и  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила; и фенил- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, где указанный фенил необязательно замещен одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкокси,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, циано, галогена и нитро; или  $R^d$  и  $R^4$  совместно с атомами, к которым они присоединены, могут образовывать пирролидиновое кольцо;

$R^e$  представляет собой водород;

$R^g$  выбран из водорода,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкокси- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, карбокси- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, гало- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, гидрокси- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила,  $(\text{NR}^a\text{R}^b)\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, где  $R^a$  и  $R^b$  независимо выбраны из водорода и  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила; и фенил- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, где указанный фенил необязательно замещен одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкокси,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, циано, галогена и нитро; или  $R^g$  и  $R^7$  совместно с атомами, к которым они присоединены, могут образовывать пирролидиновое кольцо; и где пирролидин является необязательно конденсированным с циклогексильной, фенильной или индольной группой;

$R^k$  выбран из водорода и метила, или  $R^k$  и  $R^{11}$  совместно с атомами, к которым они присоединены, могут образовывать кольцо, выбранное из азетидина, пирролидина, морфолина, пиперидина, пиперазина и тетрагидротиазола; где каждое кольцо необязательно замещено от одной до четырех группами, независимо выбранными из amino, циано, метила, галогена и гидрокси; и

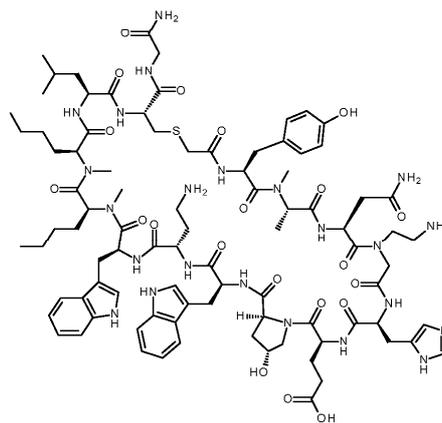
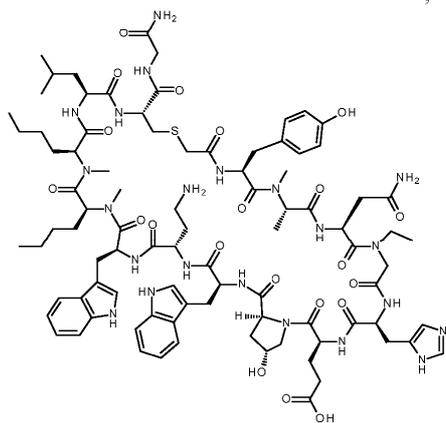
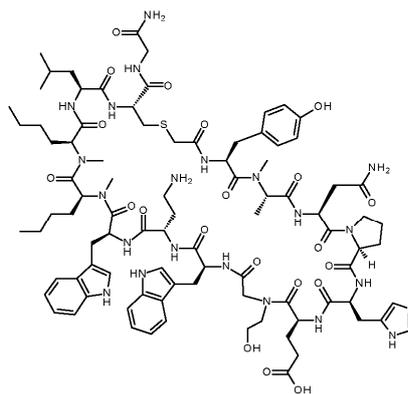
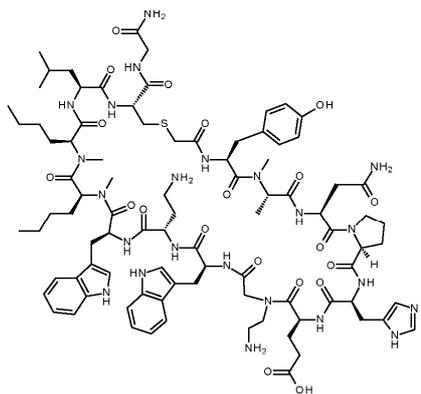
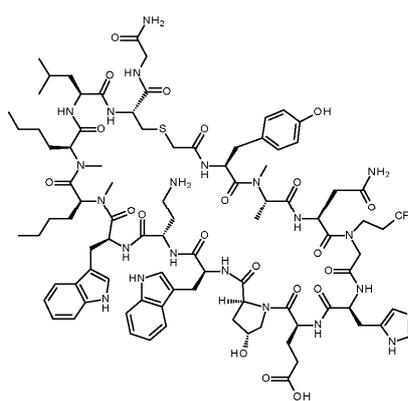
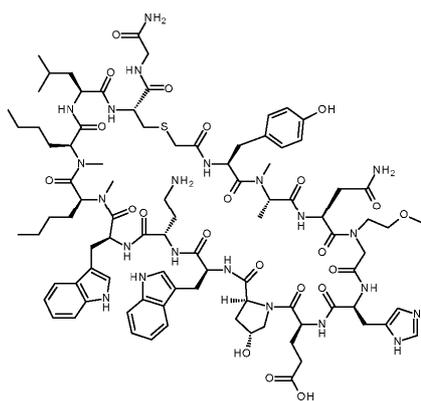
$R^l$  представляет собой метил, или  $R^l$  и  $R^{12}$  совместно с атомами, к которым они присоединены, образуют кольцо, выбранное из азетидина и пирролидина, где каждое кольцо необязательно замещено от одной до четырех группами, независимо выбранными из amino, циано, метила, галогена и гидрокси;

при условии, что по меньшей мере один из  $R^b$ ,  $R^d$ ,  $R^g$  выбран из  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкокси- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила,  $\text{C}_2$ - $\text{C}_6$ -алкила, карбокси- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, гало- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, гидрокси- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила,  $(\text{NR}^a\text{R}^b)\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, где  $R^a$  и  $R^b$  независимо выбраны из водорода и  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила; и фенил- $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, где указанный фенил необязательно замещен одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкокси,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -алкила, циано, галогена и нитро.

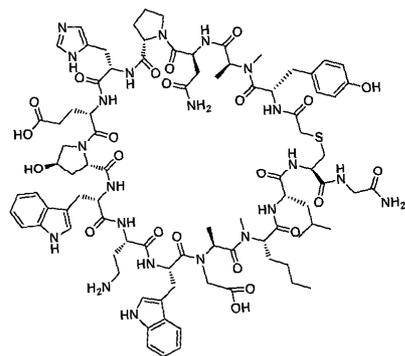
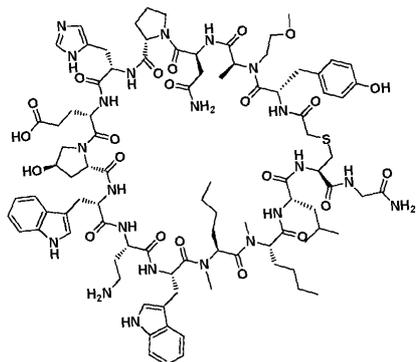
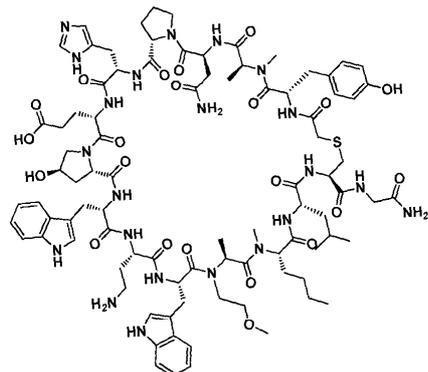
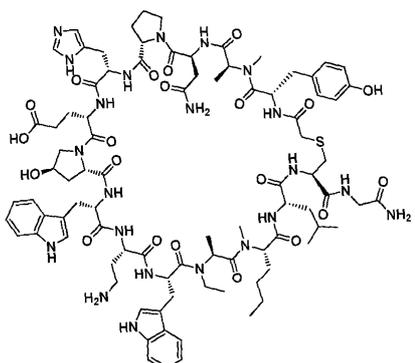
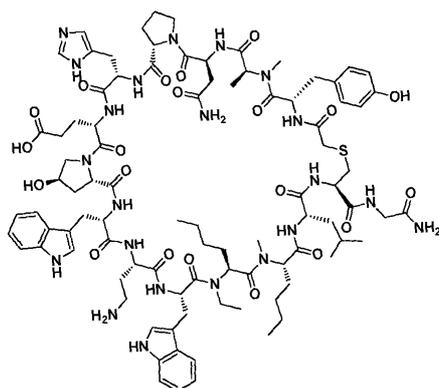
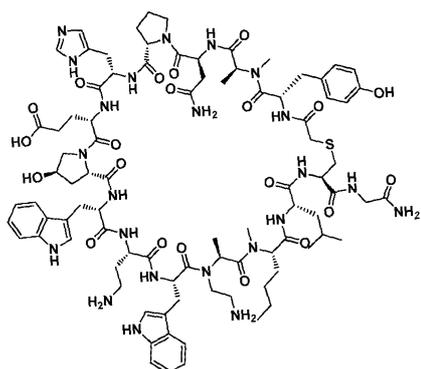
2. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $R^e$  представляет собой водород и  $R^j$  представляет собой водород.

3. Соединение, выбранное из

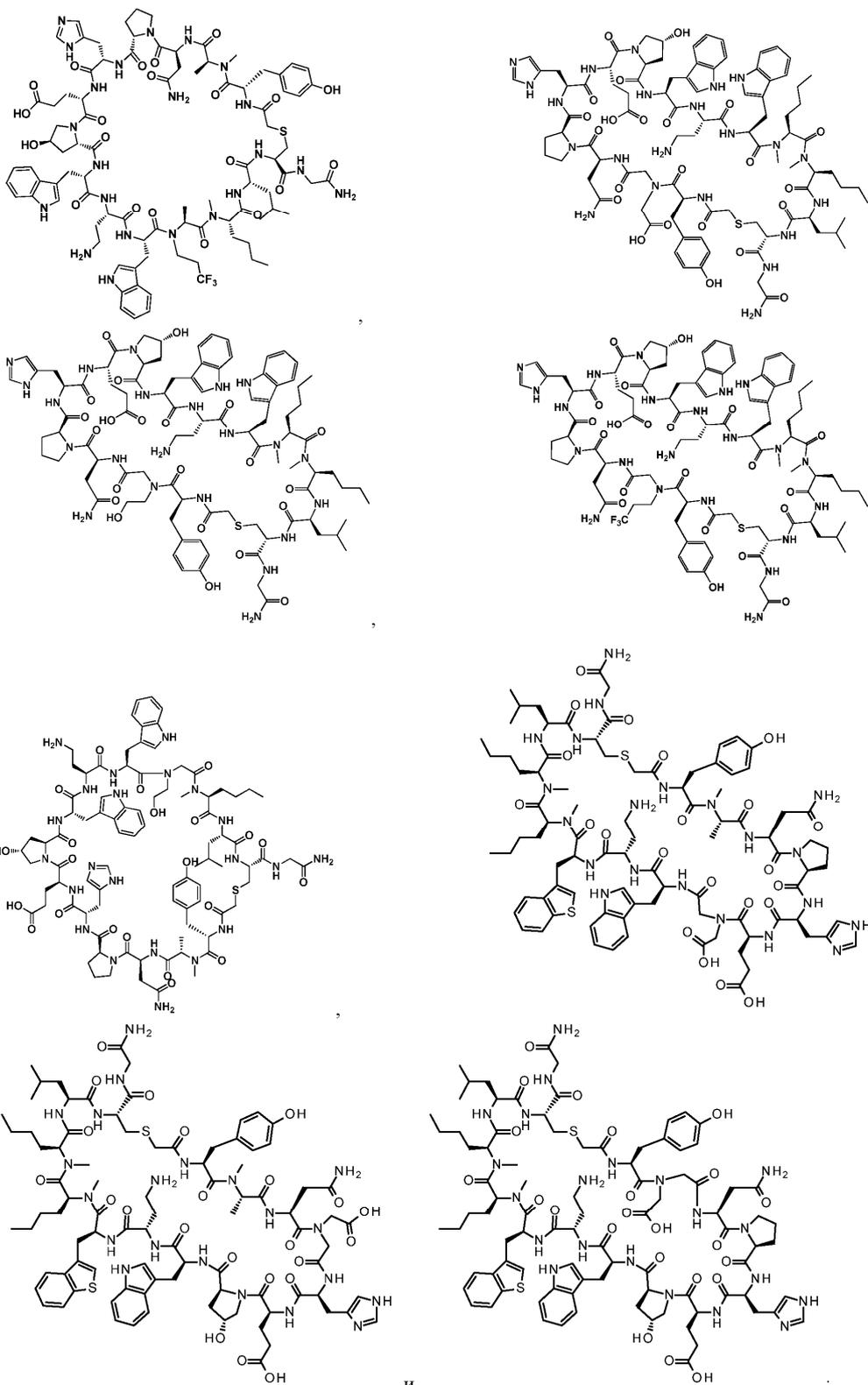












или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Способ ингибирования роста, пролиферации или метастазирования раковых клеток у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-3 или его фармацевтически приемлемой соли.

5. Способ по п.4, где рак выбран из меланомы, почечно-клеточной карциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), несквамозного NSCLC, колоректального рака, кастрационно-резистентного рака предстательной железы, рака яичников, рака желудка, гепатоцеллюлярной карциномы, карциномы поджелудочной железы, плоскоклеточного рака области головы и шеи, карциномы пищевода, желудочно-кишечного тракта и груди и злокачественного заболевания системы крови.

6. Способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-3 или его фармацевтически приемлемой соли.

7. Способ по п.6, где инфекционное заболевание вызвано вирусом.

8. Способ по п.7, где указанный вирус выбран из ВИЧ, вирусов гепатита А, гепатита В, гепатита С, герпеса и гриппа.

9. Способ лечения септического шока у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-3 или его фармацевтически приемлемой соли.

10. Способ блокирования взаимодействия PD-L1 с PD-1 и/или CD80 у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-3 или его фармацевтически приемлемой соли.

