

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035134**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.30

(21) Номер заявки
201891879

(22) Дата подачи заявки
2017.03.02

(51) Int. Cl. **C07K 7/08** (2006.01)
C07K 7/56 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

(54) ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ(31) **62/303,673**(32) **2016.03.04**(33) **US**(43) **2019.02.28**(86) **PCT/US2017/020304**(87) **WO 2017/151830 2017.09.08**

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

(72) Изобретатель:
**Аллен Мартин Патрик, Гиллис
Эрик П., Лэнгли Дэвид Р., Миллер
Майкл Мэттью, Мулл Эрик, Сунь
Ли-Цян, Йеун Кап-Сунь, Грант-Янг
Кэтерин А., Минвелл Николас А.,
Скола Пол Майкл (US)**

(74) Представитель:
**Глухарёва А.О., Лыу Т.Н., Угрюмов
В.М., Дементьев В.Н., Строкова О.В.,
Христофоров А.А., Гизатуллина Е.М.
(RU)**

(56) **WO-A1-2014151634**

TERESA A.F. CARDOTE ET AL.: "Cyclic and Macrocyclic Peptides as Chemical Tools To Recognise Protein Surfaces and Probe Protein-Protein Interactions", CHEMMEDCHEM, vol. 11, no. 8, 13 November 2015 (2015-11-13), pages 787-794, XP055370807, DE, ISSN: 1860-7179, DOI: 10.1002/cmdc.291500450, the whole document

TIMOTHY A. HILL ET AL.: "Constraining Cyclic Peptides To Mimic Protein Structural Motifs", ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, vol. 53, no. 48, 24 November 2014 (2014-11-24), pages 13020-13041, XP055370857, ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.291401058, the whole document

DONGSHENG HUANG: "Synthetic small peptides acting on B7H1 enhance apoptosis in pancreatic cancer cells", MOLECULAR MEDICINE REPORTS, vol. 6, 27 June 2012 (2012-06-27), pages 553-557, XP055133284, ISSN: 1791-2997, DOI: 10.3892/mmr.2012.970, the whole document

(57) Изобретением предполагаются новые макроциклические соединения, которые ингибируют белок-белковое взаимодействие PD-1/PD-L1 и PD-L1/CD80 и, следовательно, являются пригодными для ослабления различных заболеваний, в том числе злокачественной опухоли и инфекционных заболеваний.

B1**035134****035134****B1**

Ссылка на родственную заявку

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет по заявке на патент США с серийным номером 62/303673, поданной 4 марта 2016 года, полное содержание которой включено во всей ее полноте.

Изобретением предполагаются новые макроциклические соединения, которые ингибируют белок-белковое взаимодействие PD-1/PD-L1 и CD80/PD-L1 и, следовательно, являются пригодными для ослабления различных заболеваний, в том числе злокачественной опухоли и инфекционных заболеваний.

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

Белок PD-1 представляет собой 55 кДа трансмембранный белок типа I, который является частью суперсемейства генов Ig (Agata et al., *Int. Immunol.*, 8:765-772 (1996)). PD-1 содержит проксимальный по отношению к мембране иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) и дистальный по отношению к мембране тирозиновый перекрывающийся мотив (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, у PD-1 отсутствует мотив MYPPY, который является критически важным для связывания CD80 и CD86 (B7-2). Были идентифицированы два лиганда для PD-1, PD-L1 (B7-H1) и PD-L2 (b7-DC). Было показано, что активация Т-клеток, экспрессирующих PD-1, 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., *Em. 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 является широко распространенным в ряде человеческих злокачественных опухолей (Dong et al., *Nat. Med.*, 8:787-789 (2002)). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 приводит в результате к снижению количества опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, снижению опосредованной Т-клеточными рецепторами пролиферации и ускользанию клеток злокачественной опухоли от механизмов иммунологического надзора (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)). Угнетение иммунитета может быть обращено посредством 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. 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)). Взаимодействие PD-L1/CD80 на экспрессирующих иммунных клетках, как было показано, является ингибирующим. Было показано, что блокирование этого взаимодействия нарушает это ингибирующее взаимодействие (Paterson A.M. et al., *J. Immunol.*, 187:1097-1105 (2011); Yang J. et al., *J. Immunol.* Aug 1;187(3): 1113-9 (2011)).

Когда экспрессирующие PD-1 Т-клетки контактируют с клетками, экспрессирующими его лиганды, снижаются функциональные активности в ответ на антигенные стимулы, в том числе пролиферация, секреция цитокинов и цитотоксичность. Взаимодействия PD-1/PD-L1 или PD-L2 снижают иммунные реакции при разрешении инфекции, или рассасывании опухоли, или при развитии ауто толерантности (Keir M.E. et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 26:Epub (2008)). Хроническая стимуляция антигеном, как, например, которая происходит при опухолевом заболевании или хронических инфекциях, дает в результате Т-клетки, которые экспрессируют повышенные уровни PD-1 и являются дисфункциональными в том, что касается активности по отношению к хронически воздействующему антигену (рассматривается в Kim et al., *Curr. Opin. Imm.* (2010)). Это имеет название "истощение Т-клеток". У В-клеток также проявляется супрессия и "истощение" под действием PD-1/лиганда PD.

Блокирование лигирования PD-1/PD-L1 с применением антител к PD-L1, как было показано, восстанавливает и усиливает активацию Т-клеток во многих системах. На пациентов с запущенной злокачественной опухолью оказывает благоприятный эффект терапия с использованием моноклонального антитела к PD-L1 (Brahmer et al., *New Engl. J. Med.* (2012)). В доклинических исследованиях на животных моделях злокачественных опухолей и хронических инфекций было показано, что блокада пути с участием PD-1/PD-L1 с помощью моноклональных антител может усиливать иммунную реакцию и приводить в результате к отторжению опухоли или контролю инфекции. Противоопухолевая иммунотерапия посредством блокады PD-1/PD-L1 может усиливать терапевтическую иммунную реакцию в ряде отличающихся в гистологическом плане 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)).

Препятствование взаимодействию PD-1/PD-L1 приводит к повышенной активности Т-клеток в системах с хронической инфекцией. Блокада PD-L1 вызывала улучшенный клиренс вируса и восстанавливала иммунитет у мышей с инфекцией вирусом хронического 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, показывали усиленную защиту от виру-

семии и уменьшение содержания вируса в CD4⁺ Т-клетках (Palmer et al., J. Immunol. (2013)). Блокада PD-1/PD-L1 с помощью моноклональных антител к PD-L1 может восстанавливать in vitro антигенспецифичную функциональность Т-клеток от 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)), пациентов с HCV (Golden-Mason, J. Virol. (2007); Jeung, J. Leuk. Biol. (2007); Urbani, J. Hepatol. (2008); Nakamoto, PLoS Path. (2009); Nakamoto, Gastroenterology (2008)) и пациентов с HBV (Boni, J. Virol. (2007); Fiscaro, Gastro. (2010); Fiscaro et al., Gastroenterology (2012); Boni et al., Gastro. (2012); Penna et al., J. Hep. (2012); Raziorrough, Hepatology (2009); Liang, World J. Gastro. (2010); Zhang, Gastro. (2008)).

Также было показано, что блокада взаимодействия PD-L1/CD80 стимулирует иммунитет (Yang J., et al., J. Immunol. Aug 1;187(3): 1113-9 (2011)). Стимуляция иммунитета, являющаяся результатом блокады взаимодействия PD-L1/CD80, как было показано, усиливается посредством комбинирования с блокадой дополнительных взаимодействий PD-1/PD-L1 или PD-1/PD-L2.

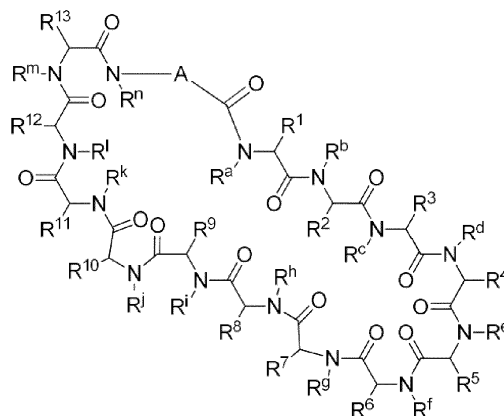
Предполагают, что изменения в фенотипах иммунных клеток являются важным фактором при септическом шоке (Hotchkiss et al., Nat. Rev. Immunol. (2013)). Они включают в себя повышенные уровни PD-1 и PD-L1 (Guignant et al., Crit. Care (2011)), клетки от пациентов с септическим шоком с повышенными уровнями 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)). Более того, мыши, у которых отсутствует экспрессия PD-1, являются более устойчивыми к симптомам септического шока, чем мыши дикого типа. Yang J., et al., J. Immunol. Aug 1; 187(3): 1113-9 (2011)). Исследования выявили, что блокада взаимодействий PD-L1 с применением антител может подавлять неприемлемые иммунные реакции и ослаблять симптомы заболевания.

Также было показано, что дополнительно к усилению иммунных реакций на хронически воздействующие антигены блокада пути с участием PD-1/PD-L1 усиливает реакции на вакцинацию, в том числе на терапевтическую вакцинацию в условиях 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⁺ t-cell responses by soluble PD-1", J. Immunother., 34(3):297-306(2011)).

Молекулы, описанные в данном документе, демонстрируют способность к блокированию взаимодействия PD-L1 с PD-1 как в биохимических, так и в клеточных экспериментальных системах. Эти результаты указывают на потенциал для терапевтического введения для усиления иммунитета при злокачественной опухоли или хронической инфекции, в том числе в виде терапевтической вакцины.

Макроциклические соединения, описанные в данном документе, являются способными к ингибированию взаимодействия PD-L1 с PD-1 и с CD80. Эти соединения продемонстрировали высокую эффективность связывания с PD-L1, блокаду взаимодействия PD-L1 либо с PD-1, либо с CD80, и они являются способными к стимуляции усиленной функциональной активности Т-клеток, что, следовательно, делает их кандидатами для парентеральных, пероральных, легочных, назальных, буккальных составов и составов с замедленным высвобождением.

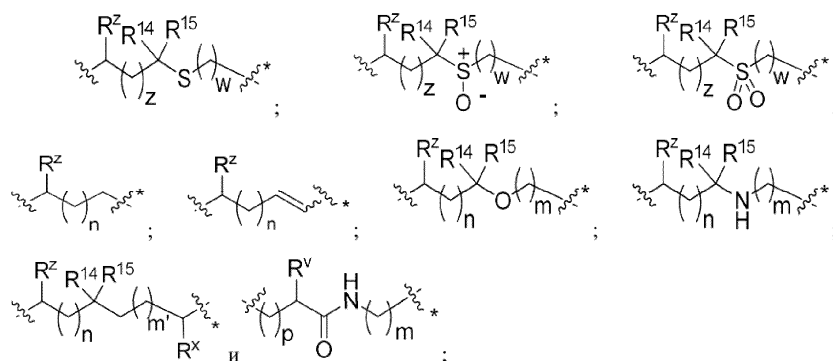
В соответствии с одним аспектом изобретением предполагается соединение формулы (I)



(I)

или его фармацевтически приемлемая соль, причем

A выбран из связи



причем

обозначает точку прикрепления к карбонильной группе и

обозначает точку прикрепления к атому азота;

z равно 0, 1 или 2;

w равно 1 или 2;

n равно 0 или 1;

m равно 1 или 2;

m' равно 0 или 1;

p равно 0, 1 или 2;

R^x выбран из водорода, амина, гидроксид и метила;

R¹⁴ и R¹⁵ независимо выбраны из водорода и метила; и

R^z выбран из водорода и -C(O)NHR¹⁶; при этом R¹⁶ выбран из водорода, -CHR¹⁷C(O)NH₂, -CHR¹⁷C(O)NHCHR¹⁸C(O)NH₂ и -CHR¹⁷C(O)NHCHR¹⁸C(O)NHCH₂C(O)NH₂; при этом R¹⁷ выбран из водорода и -CH₂OH, и при этом R¹⁸ выбран из водорода и метила;

R^v представляет собой водород или боковую цепь природной аминокислоты;

каждый из R^a и R^j независимо выбран из водорода и метила;

R^c, R^f, R^h, Rⁱ, R^m и Rⁿ представляют собой водород;

R¹, R⁸ и R¹⁰ независимо выбраны из боковой цепи природной аминокислоты и боковой цепи не встречающейся в природе аминокислоты;

R³ и R⁶ независимо выбраны из боковой цепи природной аминокислоты и боковой цепи не встречающейся в природе аминокислоты, или R³ и R⁶ вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, необязательно одну двойную связь и необязательно одну -C(O)NH- или -NHC(O)- группу;

R⁹ и R¹³ независимо выбраны из боковой цепи природной аминокислоты и боковой цепи не встречающейся в природе аминокислоты, или R⁹ и R¹³ вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, необязательно одну двойную связь и необязательно одну -C(O)NH- или -NHC(O)- группу;

R⁷ выбран из боковой цепи природной аминокислоты и боковой цепи не встречающейся в природе аминокислоты; или R⁷ и R¹⁶ вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, необязательно одну двойную связь и необязательно одну -C(O)NH- или -NHC(O)- группу; или R⁷ и R^g могут образовывать кольцо, как описано ниже;

при условии, что по меньшей мере один из R³ и R⁶; R⁹ и R¹³, и R⁷ и R¹⁶ образует мостик;

R⁵ представляет собой боковую цепь природной аминокислоты или боковую цепь не встречающейся в природе аминокислоты, или R³ и R⁵ вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, необязательно одну двойную связь и необязательно одну -C(O)NH- или -NHC(O)- группу; или R⁵ и R^e могут образовывать кольцо, как описано ниже;

R², R⁴, R¹¹ и R¹² независимо выбраны из боковой цепи природной аминокислоты и боковой цепи не встречающейся в природе аминокислоты или образуют кольцо с соответствующей соседней R-группой, как описано ниже;

R^b представляет собой метил, или R^b и R² вместе с атомами, к которым прикреплены, образуют кольцо, выбранное из азетидина, пирролидина, морфолина, пиперидина, пиперазина и тетрагидротиазола; при этом каждое кольцо необязательно замещено одной-четырьмя группами, независимо выбранными из амина, циано, метила, галогена и гидроксид;

R^d представляет собой водород или метил, или R^d и R⁴ вместе с атомами, к которым они прикреплены, могут образовывать кольцо, выбранное из азетидина, пирролидина, морфолина, пиперидина, пиперазина и тетрагидротиазола; при этом каждое кольцо необязательно замещено одной-четырьмя группами, независимо выбранными из амина, циано, метила, галогена, гидроксид и фенила;

R^e представляет собой водород или метил, или R^e и R⁵ вместе с атомами, к которым прикреплены,

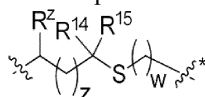
образуют кольцо, выбранное из азетидина, пирролидина, морфолина, пиперидина, пиперазина и тетрагидротиазола; при этом каждое кольцо необязательно замещено одной-четырьмя группами, независимо выбранными из amino, циано, метила, галогена и гидроксид;

R^8 представляет собой водород или метил, или R^8 и R^7 вместе с атомами, к которым они прикреплены, могут образовывать кольцо, выбранное из азетидина, пирролидина, морфолина, пиперидина, пиперазина и тетрагидротиазола; при этом каждое кольцо необязательно замещено одной-четырьмя группами, независимо выбранными из amino, бензила, необязательно замещенного галогенной группой, бензилокси, циано, циклогексила, метила, галогена, гидроксид, изохинолинилокси, необязательно замещенного метоксигруппой, хинолинилокси, необязательно замещенного галогенной группой, и тетразолила; и при этом пирролидиновое и пиперидиновое кольцо необязательно конденсированы с циклогексильной, фенильной или индольной группой;

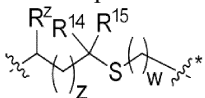
R^k представляет собой водород или метил, или R^k и R^{11} вместе с атомами, к которым прикреплены, образуют кольцо, выбранное из азетидина, пирролидина, морфолина, пиперидина, пиперазина и тетрагидротиазола; при этом каждое кольцо необязательно замещено одной-четырьмя группами, независимо выбранными из amino, циано, метила, галогена и гидроксид; и

R^1 представляет собой метил, или R^1 и R^{12} вместе с атомами, к которым они прикреплены, образуют кольцо, выбранное из азетидина и пирролидина, при этом каждое кольцо необязательно замещено одной-четырьмя группами, независимо выбранными из amino, циано, метила, галогена и гидроксид.

В соответствии с первым вариантом осуществления первого аспекта изобретением предполагается соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, при этом А представляет собой



В соответствии со вторым вариантом осуществления первого аспекта изобретением предполагается соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, при этом А представляет собой



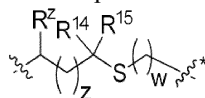
z равно 0;

w равно 1;

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

R^Z представляет собой $-C(O)NHR^{16}$.

В соответствии с третьим вариантом осуществления первого аспекта изобретением предполагается соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, при этом А представляет собой



z равно 0;

w равно 1;

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

R^Z представляет собой $-C(O)NHR^{16}$;

R^1 представляет собой фенил- C_1 - C_3 алкил, при этом фенил необязательно замещен гидроксид;

R^2 представляет собой C_1 - C_7 алкил;

R^3 представляет собой $-CH_2C(O)NH_2$, или R^3 и R^6 вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, необязательно одну двойную связь, и необязательно одну $-C(O)NH$ - или $-NHC(O)$ - группу, или R^3 и R^5 вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, необязательно одну двойную связь и необязательно одну $-C(O)NH$ -или $-NHC(O)$ - группу,

R^4 и R^d вместе с атомами, к которым они прикреплены, образуют пирролидиновое кольцо;

R^5 выбран из C_1 - C_7 алкила и $-CH_2$ (имидазолила), необязательно замещенного $CF_3C(O)$ -, или R^3 и R^5 вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, необязательно одну двойную связь и необязательно одну $-C(O)NH$ - или $-NHC(O)$ - группу;

R^6 выбран из C_1 - C_7 алкила и $-(CH_2)_2C(O)NH_2$, или R^3 и R^6 вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, необязательно одну двойную связь и необязательно одну $-C(O)NH$ - или $-NHC(O)$ - группу;

R^7 представляет собой водород, или R^7 и R^8 вместе с атомами, к которым они прикреплены, образуют пирролидиновое кольцо, необязательно замещенное гидроксигруппой, или R^7 и R^{16} вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, необязательно одну двойную связь и необязательно одну $-C(O)NH$ - или $-NHC(O)$ - группу;

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

R^9 выбран из гидроксиметила и $-CH_2CH_2CO_2H$, или R^9 и R^{13} вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, необязательно одну двойную связь и необязательно одну $-C(O)NH$ - или

-NHC(O)- группу;

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

R^{11} представляет собой C_1 - C_7 алкил;

R^{12} представляет собой C_1 - C_7 алкил; и

R^{13} выбран из C_1 - C_7 алкила и $-(CH_2)_3NHC(NH)NH_2$, или R^9 и R^{13} вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, необязательно одну двойную связь и необязательно одну $-C(O)NH$ - или $-NHC(O)-$ группу.

В соответствии со вторым аспектом изобретением предполагается способ усиления, стимуляции и/или повышения иммунной реакции у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его терапевтически приемлемой соли. В соответствии с первым вариантом осуществления второго аспекта способ дополнительно предусматривает введение дополнительного средства до, после или одновременно с соединением формулы (I) или его терапевтически приемлемой солью. В соответствии со вторым вариантом осуществления второго аспекта дополнительное средство представляет собой противомикробное средство, противовирусное средство, цитотоксическое средство и/или модификатор иммунных реакций. В соответствии с третьим вариантом осуществления второго аспекта дополнительное средство представляет собой ингибитор HDAC. В соответствии с четвертым вариантом осуществления второго аспекта дополнительное средство представляет собой агонист TLR7 и/или TLR8.

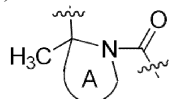
В соответствии с третьим аспектом изобретением предполагается способ ингибирования роста, пролиферации или метастазирования клеток злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ предполагает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его терапевтически приемлемой соли. Следует понимать, что указанное ингибирование может быть прямым или опосредованным. В соответствии с первым вариантом осуществления третьего аспекта злокачественная опухоль является выбранной из меланомы, почечно-клеточной карциномы, ороговевающего немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), неороговевающего NSCLC, злокачественной опухоли толстой и прямой кишки, кастрационно-резистентной злокачественной опухоли предстательной железы, злокачественной опухоли яичника, злокачественной опухоли желудка, печеночно-клеточной карциномы, карциномы поджелудочной железы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, карцином пищевода, желудочно-кишечного тракта и молочной железы и гематологической злокачественной опухоли.

В соответствии с четвертым аспектом изобретением предполагается способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его терапевтически приемлемой соли. В соответствии с первым вариантом осуществления четвертого аспекта инфекционное заболевание вызвано вирусом. В соответствии со вторым вариантом осуществления четвертого аспекта вирус является выбранным из ВИЧ, гепатита А, гепатита В, гепатита С, вируса герпеса и гриппа.

В соответствии с пятым аспектом изобретением предполагается способ лечения септического шока у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества одного или нескольких макроциклических соединений, описанных в данном документе.

В соответствии с шестым аспектом изобретением предполагается способ блокирования взаимодействия PD-L1 с PD-1 и/или CD80 у субъекта, причем указанный способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного макроциклического соединения, описанного в данном документе.

Следует понимать, что в соединениях формулы (I), в которых боковые цепи R являются частью кольца, которое замещено метилом, метильная группа может находиться на любом замещаемом атоме углерода в кольце, в том числе на углероде, который является частью исходной макроциклической структуры. В соединениях согласно настоящему раскрытию присутствует по меньшей мере один углерод на остоле кольца, которое имеет четыре заместителя, отличных от водорода, и не представляет собой альфа-метил-замещенное кольцо формулы (II)



(II).

при этом A представляет собой кольцо, которое описано в пунктах формулы изобретения, и при этом  указывает на точки прикрепления к остальной части макроциклической структуры.

В соединениях формулы (I) предпочтительные боковые цепи R^1 представляют собой: фенилаланин, тирозин, 3-тиен-2-ил, 4-метилфенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 3-метоксифенилаланин, изотриптофан, 3-метилфенилаланин, 1-нафтилаланин, 3,4-дифторфенилаланин, 4-фторфенилаланин, 3,4-диметоксифенилаланин, 3,4-дихлорфенилаланин, 4-диформетилфенилаланин, 2-метилфенилаланин, 2-нафтилаланин,

триптофан, 4-пиридинил, 4-бромфенилаланин, 3-пиридинил, 4-трифторметилфенилаланин, 4-карбокси-фенилаланин, 4-метоксифенилаланин, бифенилаланин и 3-хлорфенилаланин и 2,4-диаминобутан.

В соединениях формулы (I), в которых R^2 не является частью кольца, предпочтительные боковые цепи R^2 представляют собой: аланин, серин и глицин.

В соединениях формулы (I) предпочтительные боковые цепи R^3 представляют собой аспарагин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, глутамин, серин, орнитин, лизин, гистидин, треонин, лейцин, аланин, 2,3-диаминопропан и 2,4-диаминобутан.

В соединениях формулы (I), в которых R^4 не является частью кольца, предпочтительные боковые цепи R^4 представляют собой валин, аланин, изолейцин и глицин.

В соединениях формулы (I) предпочтительные боковые цепи R^5 представляют собой аминометан, гистидин, аспарагин, 2,3-диаминопропан, серин, глицин, 2,4-диаминобутан, треонин, аланин, лизин, аспарагиновую кислоту, аланин и 3-тиазолилаланин.

В соединениях формулы (I) предпочтительные боковые цепи R^6 представляют собой лейцин, аспарагиновую кислоту, аспарагин, глутаминовую кислоту, глутамин, серин, лизин, 3-циклогексан, треонин, орнитин, 2,4-диаминобутан, валин, аргинин и орнитин(COCH_3).

В соединениях формулы (I), в которых R^7 не является частью кольца, предпочтительные боковые цепи R^7 представляют собой глицин, 2,4-диаминобутан, серин, лизин, аргинин, орнитин, гистидин, аспарагин, глутамин, аланин и 2,4-диаминобутан($\text{C}(\text{O})$ циклобутан).

В соединениях формулы (I) предпочтительные боковые цепи R^8 представляют собой триптофан и 1,2-бензотиазолилаланин.

В соединениях формулы (I) предпочтительные боковые цепи R^9 представляют собой серин, гистидин, лизин, орнитин, 2,4-дибутиламин, треонин, лизин, глицин, глутаминовую кислоту, валин, 2,3-диаминопропан, аргинин, аспарагиновую кислоту и тирозин.

В соединениях формулы (I) предпочтительные боковые цепи R^{10} представляют собой необязательно замещенный триптофан, бензотиазолилаланин, 1-нафтилаланин и метионин.

В соединениях формулы (I) предпочтительные боковые цепи R^{11} представляют собой норлейцин, лейцин, аспарагин, фенилаланин, метионин, этоксиметан, аланин, триптофан, изолейцин, фенилпропан, глутаминовую кислоту, гексан и гептан.

В соединениях формулы (I), в которых R^{12} не является частью кольца, предпочтительные боковые цепи R^{12} представляют собой норлейцин, аланин, этоксиметан, метионин, серин, фенилаланин, метоксигексан, лейцин, триптофан, изолейцин, глутаминовую кислоту, гексан, гептан и глицин.

В соединениях формулы (I) предпочтительные боковые цепи R^{13} представляют собой аргинин, орнитин, аланин, 2,4-диаминобутан, 2,3-диаминопропан, лейцин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, серин, лизин, треонин, циклопропилметан, глицин, валин, изолейцин, гистидин и 2-аминобутан.

В соответствии с изобретением авторами настоящего изобретения были открыты соединения, которые специфично связываются с PD-L1 и являются способными к ингибированию взаимодействия PD-L1 с PD-1 и CD80. Эти макроциклические соединения проявляют иммуномодуляторную эффективность *in vitro*, что, следовательно, делает их терапевтическими кандидатами для лечения различных заболеваний, в том числе злокачественной опухоли и инфекционных заболеваний.

Термины "специфичное связывание" или "специфично связываются" относятся ко 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 характеризуется специфичным связыванием в отношении белок-связывающего сайта "А", присутствие соединения в реакционной смеси, содержащей белок, включающий в себя сайт связывания А, и меченое соединение, которое специфично связывается с белок-связывающим сайтом А, будет снижать количество меченого соединения, связавшегося с белком. В отличие от этого неспецифическое связывание соединения с белком не приводит в результате к зависимому от концентрации вытеснению меченого соединения из белка.

Предполагается, что настоящее раскрытие включает в себя все изотопы атомов, встречающихся в данных соединениях. Изотопы включают в себя те атомы, которые имеют одинаковое атомное число, но отличающиеся массовые числа. В качестве общего примера, и без ограничения, изотопы водорода включают в себя дейтерий и тритий. Изотопы углерода включают в себя ^{13}C и ^{14}C . Меченые изотопами соединения согласно настоящему изобретению обычно могут быть получены с помощью общепринятых методов, известных специалистам в данной области техники, или с помощью способов, аналогичных тем, которые описаны в данном документе, с применением соответствующего меченого изотопом реактива вместо немеченого реактива, используемого в ином случае. Такие соединения могут иметь ряд потенциальных применений, например, в качестве стандартов и реактивов при определении биологической активности. В случае стабильных изотопов такие соединения могут иметь потенциал для благоприятной модификации биологических, фармакологических или фармакокинетических свойств.

Дополнительный аспект настоящего изобретения, описанного в данном документе, представляет собой применение раскрытых соединений в качестве меченых радиоизотопами лигандов для разработки анализов связывания лигандов или для мониторинга *in vivo* адсорбции, метаболизма, распре-

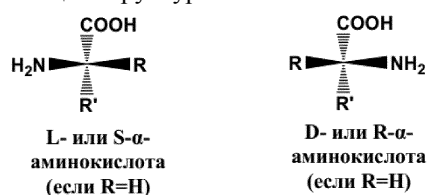
деления, связывания с рецептором или занятия рецептора или расположения соединения. Например, макроциклическое соединение, описанное в данном документе, может быть получено с применением радиоактивного изотопа ^{125}I , и полученное в результате меченое радиоизотопом соединение можно применять для разработки анализа связывания или для исследований метаболизма. В качестве альтернативы и с той же целью, макроциклическое соединение, описанное в данном документе, может быть превращено в меченую радиоизотопом форму посредством каталитического тритирования с применением способов, известных специалистам в данной области техники.

Макроциклические соединения согласно настоящему раскрытию также можно применять в качестве визуализирующих средств для PET посредством присоединения радиоактивного маркера с применением способов, известных специалистам в данной области техники.

Предпочтительные соединения включают в себя по меньшей мере одно из макроциклических соединений, представленных в данном документе, и эти соединения могут быть включены в фармацевтические композиции и комбинации.

Определения, представленные в данном документе, относятся без ограничения к терминам, которые применяются в данном описании, если они не ограничиваются иным образом в конкретных случаях.

Средние специалисты в области химии аминокислот и пептидов знают, что аминокислота включает в себя соединение, представленное общей структурой



в которой R и R' являются такими, как обсуждается в данном документе.

Если не указано иное, термин "аминокислота", который используется в данном документе, отдельно или в составе другой группы включает в себя, без ограничения, аминогруппу и карбоксильную группу, связанную с одним и тем же углеродом, который называется "α" углеродом, в которой R и/или R' может представлять собой природную или не встречающуюся в природе боковую цепь, в том числе водород. Абсолютная "S" конфигурация на "α" углероде обычно называется "L" или "природной" конфигурацией. В случае когда и "R", и "R'" (штрих) заместители представляют собой водород, аминокислота представляет собой глицин и не является хиральной.

Термины "боковая цепь природной аминокислоты" и "боковая цепь встречающейся в естественных условиях аминокислоты" в контексте данного документа относятся к боковой цепи любой из встречающихся в естественных условиях 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-аминокислоты).

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

C₂-C₇алкенила, C₁-C₃алкокси-C₁-C₃алкила, C₁-C₆алкоксикарбонил-C₁-C₃алкила, C₁-C₇алкила, C₁-C₃алкилсульфанил-C₁-C₃алкила, амидо-C₁-C₃алкила, амино-C₁-C₃алкила, азаиндолил-C₁-C₃алкила, бензотиазолил-C₁-C₃алкила, бензотиенил-C₁-C₃алкила, бензилокси-C₁-C₃алкила, карбокси-C₁-C₃алкила, C₃-C₁₄циклоалкил-C₁-C₃алкила, дифенилметила, фуранил-C₁-C₃алкила, имидазолил-C₁-C₃алкила, нафтил-C₁-C₃алкила, пиридинил-C₁-C₃алкила, тиазолил-C₁-C₃алкила, тиенил-C₁-C₃алкила;

бифенил-C₁-C₃алкила, в котором бифенил является необязательно замещенным метильной группой; гетероциклила, необязательно замещенного одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из C₁-C₄алкокси, C₁-C₄алкила, C₁-C₃алкилсульфониламино, амидо, амино, амино-C₁-C₃алкила, аминосульфона, карбокси, циано, галогена, галоген-C₁-C₃алкила, гидрокси, -NC(NH₂)₂, нитро и -OP(O)(OH)₂;

индолил-C₁-C₃алкила, в котором индолильная часть является необязательно замещенной одной группой, выбранной из C₁-C₃алкила, карбокси-C₁-C₃алкила, галогена, гидрокси и фенила, при этом фенил является необязательно дополнительно замещенным одной, двумя или тремя группами, независимо выбранными из C₁-C₃алкокси, C₁-C₃алкила и галогена;

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

NR^aR^b(C₁-C₇алкила), при этом R^a и R^b являются независимо выбранными из водорода, C₂-

С₄алкенилоксикарбонила, С₁-С₃алкила, С₁-С₃алкилкарбонила, С₃-С₆циклоалкилкарбонила, фуранилкарбонила и фенилкарбонила. Когда алкильный линкер содержит более чем один углерод, на цепи может присутствовать дополнительная NR^cR^{b'} группа.

NR^cR^d карбонил-С₁-С₃алкила, при этом R^c и R^d является независимо выбранными из водорода, С₁-С₃алкила и трифенилметила;

фенил-С₁-С₃алкила, при этом фенильная часть является необязательно замещенной одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из С₁-С₄алкокси, С₁-С₄алкила, С₁-С₃алкилсульфониламино, амидо, amino, amino-С₁-С₃алкила, аминосульфона, карбокси, циано, галогена, галоген-С₁-С₃алкила, гидроксид, -NC(NH₂)₂, нитро и -OP(O)(OH)₂; и

фенокси-С₁-С₃алкила, при этом фенил является необязательно замещенным С₁-С₃алкильной группой.

Термин "С₂-С₄алкенил" в контексте данного документа относится к группе в виде линейной или разветвленной цепи из двух-четырёх атомов углерода, содержащей по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод.

Термин "С₂-С₇алкенил" в контексте данного документа относится к группе в виде линейной или разветвленной цепи из двух-семи атомов углерода, содержащей по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод.

Термин "С₂-С₄алкенилокси" в контексте данного документа относится к С₂-С₄алкенильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода.

Термин "С₁-С₃алкокси" в контексте данного документа относится к С₁-С₃алкильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода.

Термин "С₁-С₄алкокси" в контексте данного документа относится к С₁-С₄алкильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода.

Термин "С₁-С₆алкокси" в контексте данного документа относится к С₁-С₆алкильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода.

Термин "С₁-С₃алкокси-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к С₁-С₃алкоксигруппе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу.

Термин "С₁-С₆алкоксикарбонил" в контексте данного документа относится к С₁-С₆алкоксигруппе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через карбонильную группу.

Термин "С₁-С₆алкоксикарбонил-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к С₁-С₆алкоксикарбонильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу.

Термин "С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к группе, полученной из линейной или разветвленной цепи насыщенного углеводорода, содержащей от одного до трех атомов углерода.

Термин "С₁-С₄алкил" в контексте данного документа относится к группе, полученной из линейной или разветвленной цепи насыщенного углеводорода, содержащей от одного до четырех атомов углерода.

Термин "С₁-С₆алкил" в контексте данного документа относится к группе, полученной из линейной или разветвленной цепи насыщенного углеводорода, содержащей от одного до шести атомов углерода.

Термин "С₁-С₃алкиламино" в контексте данного документа относится к -NHR¹, причем R¹ представляет собой С₁-С₃алкильную группу.

Термин "С₁-С₃алкилкарбонил" в контексте данного документа относится к С₁-С₃алкильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через карбонильную группу.

Термин "С₁-С₃алкилсульфанил" в контексте данного документа относится к С₁-С₃алкильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через атом серы.

Термин "С₁-С₃алкилсульфанил-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к С₁-С₃алкилсульфанильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу.

Термин "С₁-С₃алкилсульфонил" в контексте данного документа относится к С₁-С₃алкильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через сульфонильную группу.

Термин "С₁-С₃алкилсульфониламино" в контексте данного документа относится к С₁-С₃алкилсульфонильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через аминогруппу.

Термин "амидо" в контексте данного документа относится к -C(O)NH₂.

Термин "амидо-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к амидогруппе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу.

Термин "амино" в контексте данного документа относится к -NH₂.

Термин "амино-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к аминогруппе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу.

Термин "аминосульфонил" в контексте данного документа относится к аминогруппе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через сульфонильную группу.

Термин "азаиндолил-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к азаиндолильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу. Азаиндолильная группа может быть прикреплена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

Термин "бензотиазолил-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к бензотиазолильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу. Бензотиазолильная группа может быть прикреплена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

Термин "бензотиенил-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к бензотиенильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу. Бензотиенильная группа может быть прикреплена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

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

Термин "бензилокси-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к бензилоксигруппе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу.

Термин "бифенил-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к бифенильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу. Бифенильная группа может быть прикреплена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

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

Термин "карбокси" в контексте данного документа относится к -CO₂H.

Термин "карбокси-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к карбоксигруппе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу.

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

Термин "С₃-С₁₄циклоалкил" в контексте данного документа относится к насыщенной моноциклической, бициклической или трициклической углеводородной кольцевой системы, имеющей от трех до четырнадцати атомов углерода и ноль гетероатомов. Бициклические и трициклические кольца могут быть конденсированными, спироциклическими или мостиковыми. Типичные примеры циклоалкильных групп включают в себя, без ограничения, циклопропил, цикlopентил, бицикло[3.1.1]гептил и адамантил.

Термин "С₃-С₁₄циклоалкил-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к С₃-С₁₄циклоалкильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу.

Термин "С₃-С₁₄циклоалкилкарбонил" в контексте данного документа относится к С₃-С₁₄циклоалкильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через карбонильную группу.

Термин "С₁-С₃диалкиламино" в контексте данного документа относится к -NR¹R², при этом каждый из R¹ и R² представляет собой алкильную группу, содержащую от одного до трех атомов углерода. Группы могут быть одинаковыми или отличающимися.

Термин "фуранил-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к фуранильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу. Фуранильная группа может быть прикреплена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

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

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

Термин "галоген-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к С₁-С₃алкильной группе, замещенной одним, двумя или тремя атомами галогена.

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

Термин "гетероцикл" в контексте данного документа 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, и шести- и семичленные кольца имеют от нуля до трех двойных связей. Термин "гетероцикл" также включает в себя бициклические группы, в которых гетероциклическое кольцо является слитым с четырех-шестичленным ароматическим или неароматическим карбоциклическим кольцом или другой моноциклической гетероциклической группой. Гетероциклические группы согласно настоящему раскрытию являются прикрепленными к исходному молекулярному фрагменту через атом углерода в группе. Примеры гетероциклических групп включают в себя, без ограничения, бензотиенил, фурил, имидазолил, индолинил, индолил, изотиазолил, изоксазолил, морфолинил, оксазолил, пиперазинил, пиперидинил, пиразолил, пиридинил, пирролидинил, пирролопиридинил, пирролил, тиазолил, тиенил и тиоморфолинил.

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

Термин "имидазолил-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к имидазолильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу. Имидазолильная группа может быть прикреплена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

Термин "индолил-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к индолильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через С₁-С₃алкильную группу. Индолильная группа может быть прикреплена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

Термин "нафтил-С₁-С₃алкил" в контексте данного документа относится к нафтильной группе, при-

крепленной к исходному молекулярному фрагменту через C_1 - C_3 алкильную группу. Нафтильная группа может быть прикреплена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

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

Термин " NR^aR^b " в контексте данного документа относится к двум группам, R^a и R^b , которые являются прикрепленными к исходному молекулярному фрагменту через атом азота. R^a и R^b являются независимо выбранными из водорода, C_2 - C_4 алкенилоксикарбонила, C_1 - C_3 алкилкарбонила, C_3 - C_6 циклоалкилкарбонила, фуранилкарбонила и фенилкарбонила.

Термин " NR^aR^b (C_1 - C_3)алкил" в контексте данного документа относится к NR^aR^b группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через C_1 - C_3 алкильную группу.

Термин " NR^cR^d " в контексте данного документа относится к двум группам, R^c и R^d , которые являются прикрепленными к исходному молекулярному фрагменту через атом азота. R^c и R^d являются независимо выбранными из водорода, C_1 - C_3 алкила и трифенилметила.

Термин " NR^cR^d карбонил" в контексте данного документа относится к NR^cR^d группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через карбонильную группу.

Термин " NR^cR^d карбонил- C_1 - C_3 алкил" в контексте данного документа относится к NR^cR^d карбонильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через C_1 - C_3 алкильную группу.

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

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

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

Термин "пиридинил- C_1 - C_3 алкил" в контексте данного документа относится к пиридинильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через C_1 - C_3 алкильную группу. Пиридинильная группа может быть прикреплена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

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

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

Термин "тиазолил- C_1 - C_3 алкил" в контексте данного документа относится к тиазолильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через C_1 - C_3 алкильную группу. Тиазолильная группа может быть прикреплена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

Термин "тиенил- C_1 - C_3 алкил" в контексте данного документа относится к тиенильной группе, прикрепленной к исходному молекулярному фрагменту через C_1 - C_3 алкильную группу. Тиенильная группа может быть прикреплена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

Термин "лечение" относится к: (i) предупреждению возникновения заболевания, нарушения или состояния у пациента, который может быть предрасположен к заболеванию, нарушению и/или состоянию, но у которого оно еще не было диагностировано; (ii) ингибированию заболевания, нарушения или состояния, т.е. задержке его развития; и (iii) облегчению заболевания, нарушения или состояния, т.е. вызывает регрессию заболевания, нарушения и/или состояния и/или симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением и/или состоянием.

Связывание макроциклических соединений с PD-L1 может быть измерено, например, с помощью способов, таких как анализы гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), изотермическая титрационная калориметрия (ITC), ядерная магнитно-резонансная спектроскопия (NMR) и т.п. Кроме того, связывание макроциклических соединений с PD-L1, экспрессирующимся на поверхности клеток, может быть измерено, как описано в данном документе в клеточных анализах связывания.

Введение терапевтического средства, описанного в данном документе, включает в себя, без ограничения, введение терапевтически эффективного количества терапевтического средства. Термин "терапевтически эффективное количество" в контексте данного документа относится, без ограничения, к количеству терапевтического средства для лечения или предупреждения состояния, поддающегося лечению с помощью введения композиции ингибиторов связывания PD-1/PD-L1, описанных в данном документе. Это количество представляет собой количество, достаточное для проявления выявляемого терапевтического, или профилактического, или ослабляющего эффекта. Эффект может включать в себя, например и без ограничения, лечение или предупреждение состояний, перечисленных в данном документе. Точное эффективное количество для субъекта будет зависеть от размера и состояния здоровья субъекта, природы и степени выраженности состояния, подлежащего лечению, рекомендаций лечащего врача и терапевтических средств или комбинации терапевтических средств, выбранных для введения. Таким образом, предварительное определение точного эффективного количества не является целесообразным.

В соответствии с другим аспектом настоящее раскрытие относится к способам ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта с применением макроциклических соединений согласно настоящему раскрытию. Как демонстрируется в данном документе, макроциклические соединения согласно настоя-

щему раскрытию являются способными к связыванию с PD-L1, нарушению взаимодействия между PD-L1 и PD-1, конкуренции со связыванием PD-L1 с моноклональными антителами к PD-1, которые, как известно, блокируют взаимодействие с PD-1, усиливая CMV-специфическую секрецию IFN γ Т-клетками и усиливая ВИЧ-специфическую секрецию IFN γ Т-клетками. Как результат, макроциклические соединения согласно настоящему раскрытию являются пригодными для модификации иммунной реакции, лечения заболеваний, таких как злокачественная опухоль или инфекционное заболевание, стимуляции защитной аутоиммунной реакции или для стимуляции антигенспецифических иммунных реакций (например, посредством совместного введения блокирующих PD-L1 соединений с антигеном, представляющим интерес).

Для того чтобы настоящее раскрытие можно было легче понять, в первую очередь определены некоторые термины. Дополнительные определения изложены в подробном описании.

Термины "лиганд 1 белка программируемой гибели", "лиганд 1 белка программируемой гибели клеток", "белок PD-L1", "PD-L1", "PDL1", "PDCDL1", "hPD-L1", "hPD-L1", "CD274" и "B7-H1" используются взаимозаменяемо и включают в себя варианты, изоформы, гомологи человеческого PD-L1 из других видов и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с PD-L1. Полную последовательность PD-L1 можно найти в GENBANK® под номером доступа NP_054862.

Термины "белок программируемой гибели 1", "белок программируемой гибели клеток 1", "белок PD-1", "PD-1", "PDI1", "PDCDI1", "hPD-1" и "hPD-I" используются взаимозаменяемо и включают в себя варианты, изоформы, гомологи человеческого PD-1 из других видов и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с PD-1. Полную последовательность PD-1 можно найти в GENBANK® под номером доступа U64863.

Термины "цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4", "CTLA-4", "CTLA4", "антиген CTLA-4" и "CD152" (см., например, Murata, Am. J. Pathol., 155:453-460 (1999)) используются взаимозаменяемо и включают в себя варианты, изоформы, гомологи человеческого CTLA-4 из других видов и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с CTLA-4 (см., например, Balzano, Int. J. Cancer Supply 7:28-32 (1992)). Полную последовательность нуклеиновой кислоты CTLA-4 можно найти в GENBANK® под номером доступа L15006.

Термин "иммунная реакция" относится к действию, например, лимфоцитов, антиген-презентирующих клеток, фагоцитов, гранулоцитов и растворимых макромолекул, продуцируемых вышеуказанными клетками или печенью (в том числе макроциклы, цитокины и компоненты комплемента), которое приводит в результате к селективному повреждению, разрушению или удалению из организма человека проникших патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенов, злокачественных клеток или, в случаях аутоиммунных реакций или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей.

"Неблагоприятное явление" (АЕ) в контексте данного документа представляет собой любой неблагоприятный и обычно непредусмотренный, даже нежелательный, признак (в том числе ненормальные результаты лабораторных исследований), симптом или заболевание, ассоциированные с применением медицинского лечения. Например, неблагоприятное явление может быть ассоциировано с активацией иммунной системы или размножением клеток иммунной системы (например, Т-клеток) в ответ на лечение. Медицинское лечение может характеризоваться одним или несколькими ассоциированными АЕ, и каждое АЕ может характеризоваться одинаковым или отличающимся уровнем тяжести. Упоминание способов, способных к "изменению неблагоприятных явлений", означает схему лечения, которая снижает частоту возникновения и/или тяжесть одного или нескольких АЕ, ассоциированных с применением отличающейся схемы лечения.

В контексте данного документа "гиперпролиферативное заболевание" относится к состояниям, при которых рост клеток превышает нормальные уровни. Например, гиперпролиферативные заболевания или нарушения включают в себя злокачественные заболевания (например, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль толстой кишки, злокачественную опухоль желчного протока) и заболевания, не относящиеся к злокачественным (например, атеросклероз, доброкачественную гиперплазию и доброкачественную гипертрофию предстательной железы).

В контексте данного документа "приблизительно" или "содержащий, по существу," означают пребывание в пределах приемлемого диапазона погрешности для конкретного значения, определяемого средним специалистом в данной области техники, который отчасти будет зависеть от того, как измерено или определено значение, т.е. ограничений измерительной системы. Например, "приблизительно" или "содержащий, по существу" может означать пребывание в пределах величины одного или более чем одного стандартного отклонения в соответствии с практикой, используемой в данной области техники. В качестве альтернативы, "приблизительно" или "содержащий, по существу" может означать диапазон, составляющий вплоть до 20%. Более того, в особенности, применительно к биологическим системам или процессам термины могут означать диапазон вплоть до величины порядка измеренного значения или вплоть до величины, 5-кратно превышающей измеренное значение. В случае когда конкретные значения представлены в заявке и пунктах формулы изобретения, если не указано иное, следует предполагать, что

значение "приблизительно" или "содержащий, по существу," находится в пределах приемлемого диапазона ошибки для этого конкретного значения.

Как описано в данном документе, любой диапазон концентраций, диапазон процентных значений, диапазон соотношений или диапазон целых чисел, как следует понимать, включает в себя значение любого целого числа в пределах перечисляемого диапазона и, когда это целесообразно, их дробные значения (как например, одну десятую и одну сотую от целого числа), если не указано иное.

Конкурентные анализы.

Изобретение также направлено на макроциклические соединения, которые являются способными к конкуренции со связыванием стандартного антитела к PD-L1 (MDX-1105) по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% и по меньшей мере приблизительно на 100%. Такие макроциклические соединения могут характеризоваться структурной гомологией с одним или несколькими макроциклическими соединениями, раскрытыми в данном документе, в том числе мутантными формами, формами, имеющими консервативные замены, функциональные замены и делеции, при условии, что они специфично связываются с PD-L1. Например, если макроциклическое соединение связывается практически с тем же участком PD-L1, что и стандартное антитело к PD-L1, макроциклическое соединение должно связываться в эпитопе PD-L1, который по меньшей мере перекрывается с эпитопом PD-L1, с которым связывается моноклональное антитело к PD-L1. Перекрывающийся участок может варьировать от одного аминокислотного остатка до нескольких сотен аминокислотных остатков. Следовательно, макроциклическое соединение должно конкурировать с моноклональным антителом к PD-L1 и/или блокировать связывание моноклонального антитела к PD-L1 с PD-L1 и таким образом снижать связывание моноклонального антитела к PD-L1 с PD-L1, предпочтительно, по меньшей мере приблизительно на 50% в конкурентном анализе.

Антитела к PD-L1, которые можно применять в качестве стандартных антител с целью конкурентного анализа, являются известными в уровне техники. Например, можно применять следующие типичные антитела к PD-L1: MDX-1105 (BMS); L01X-C (Serono), L1X3 (Serono), MSB-0010718C (Serono) и антитело к PD-L1, полученное по технологии Probody (CytomX), и антитела к PD-L1, раскрытые в находящейся в совместном владении международной заявке WO 2007/005874.

Антитела к PD-1, которые можно применять в качестве стандартных антител с целью конкурентного анализа, являются известными в уровне техники. Например, можно применять следующие типичные антитела к PD-1: ниволумаб (BMS); 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 и 5F4, каждое из которых раскрыто в находящемся в совместном владении патенте США № 8008449 (BMS), MK-3475 (Merck, раскрытое в патенте США № 8168757) и антитела, раскрытые в патенте США № 7488802.

Фармацевтические композиции.

В соответствии с еще одним аспектом изобретением предполагается композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая одно макроциклическое соединение или комбинацию макроциклических соединений согласно настоящему раскрытию, составленных вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать в себя одно макроциклическое соединение или комбинацию (например, двух или более различных) макроциклических соединений, или иммуноконъюгатов, или биспецифичных молекул согласно настоящему раскрытию. Например, фармацевтическая композиция согласно настоящему раскрытию может содержать комбинацию макроциклических соединений (или иммуноконъюгатов, или биспецифичных молекул), которые связываются с разными эпитопами на антигене-мишени или которые характеризуются взаимодополняющими активностями.

Фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию также можно назначать в составе комплексной терапии, т.е. объединенными с другими средствами. Например, комплексная терапия может включать в себя макроциклическое соединение, объединенное по меньшей мере с одним отличным противовоспалительным или иммунодепрессивным средством. Примеры терапевтических средств, которые можно применять в комплексной терапии, более подробно описаны ниже в разделе, посвященном применениям макроциклических соединений согласно настоящему раскрытию.

В контексте данного документа "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотоничные средства и средства, задерживающие абсорбцию, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно, носитель является подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, посредством инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное соединение, т.е. макроциклическое соединение, иммуноконъюгат или биспецифичную молекулу можно обеспечить покрытием из материала для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические соединения согласно настоящему раскрытию могут включать в себя одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. "Фармацевтически приемлемая соль" или "терапевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исход-

ного соединения и не придает каких-либо нежелательных токсических эффектов (см., например, Berge S.M. et al., J. Pharm. Sci., 66:1-19 (1977)). Примеры таких солей включают в себя соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Соли присоединения кислоты включают в себя соли, полученные с нетоксичными неорганическими кислотами, такими как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и т.п., а также с нетоксичными органическими кислотами, такими как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксилкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Соли присоединения основания включают в себя соли, полученные с щелочно-земельными металлами, такими как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также с нетоксичными органическими аминами, такими как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему раскрытию также может включать в себя фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают в себя: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (БНА), бутилированный гидрокситолуол (БНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п. и (3) средства, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях согласно настоящему раскрытию, включают в себя воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные сложные эфиры органических кислот, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования материалов покрытия, таких как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и за счет использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Предотвращение присутствия микроорганизмов может обеспечиваться как за счет процедур стерилизации, выше, так и за счет включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательным включение в композиции изотоничных средств, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть обусловлена включением средств, которые задерживают абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед приемом. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных субстратов известно в уровне техники. За исключением тех случаев, когда любая общепринятая среда или средство являются несовместимыми с активным соединением, предполагается их применение в фармацевтических композициях согласно настоящему раскрытию. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными при условиях производства и хранения. Композицию можно составить в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет применения покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительным является включение в композицию изотоничных средств, например сахаров, многоатомных спиртов, таких как маннит, сорбит, или хлорида натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть обусловлена включением в композицию средства, которое задерживает абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина.

Стерильные инъекционные растворы можно приготовить посредством включения активного соединения в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним из вышеперечисленных ингредиентов или их комбинацией, если это необходимо, с последующей стерилизацией с помощью микрофилтрации. Обычно дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильную среду, которая содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента, а также любого дополнительного желаемого ингредиента из их раствора, ранее подвергнутого стерилизации фильтрованием.

Количество активного ингредиента, который можно объединить с материалом-носителем с получением лекарственной формы для однократного введения, будет изменяться в зависимости от субъекта, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, который можно объединить с материалом-носителем с получением лекарственной формы для однократного введения, обычно будет являться таким количеством композиции, которое обеспечивает терапевтический эффект. В целом, из общего количества в виде ста процентов это количество будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,01% до приблизительно 99% активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 0,1% до приблизительно 70%, наиболее предпочтительно от приблизительно 1% до приблизительно 30% активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Схемы дозирования корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить одну разовую дозу, несколько разделенных доз можно вводить в течение некоторого времени или дозу можно пропорционально снижать или повышать, на что указывают потребности терапевтической ситуации. Особенно преимущественным является составление парентеральных композиций в единичной лекарственной форме для упрощения введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма в контексте данного документа относится к физически раздельным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; причем каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для обеспечения желательного терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Требования в отношении единичных лекарственных форм согласно настоящему раскрытию диктуются: (а) индивидуальными характеристиками активного соединения и конкретным терапевтическим эффектом, который необходимо достичь, и (b) ограничениями в области получения составов, характерными для получения составов с таким активным соединением из соображений чувствительности у индивидов, и напрямую зависят от них.

В случае введения макроциклического соединения доза находится в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и, как правило, от 0,01 до 5 мг/кг массы тела пациента. Например, дозы 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 диапазона 1-10 мг/кг. Иллюстративная схема дозирования предусматривает введение один раз в день, два раза в день, два раза в неделю, три раза в неделю, раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в месяц, раз в три месяца или раз в 3-6 месяцев. Предпочтительные схемы дозирования макроциклического соединения согласно настоящему раскрытию включают в себя 1 мг/кг массы тела или 3 мг/кг массы тела посредством внутривенного введения, причем макроцикл дают с использованием одного из следующих режимов дозирования: (i) каждые четыре недели в ходе введения первых шести доз, затем каждые три месяца; (ii) каждые три недели; (iii) в дозе 3 мг/кг массы тела однократно с последующим введением в дозе 1 мг/кг массы тела каждые три недели.

В соответствии с некоторыми способами два или более макроциклических соединений с разными специфичностями связывания вводят одновременно, в этом случае доза каждого вводимого соединения попадает в указанные диапазоны. Соединения обычно вводят несколько раз. Интервалы между отдельными дозами могут быть, например, недельными, месячными, трехмесячными или годовыми. Интервалы также могут быть неодинаковыми, на что указывает измерение уровней макроциклического соединения к антигену-мишени в крови пациента. В соответствии с некоторыми способами дозу корректируют для достижения концентрации в плазме крови, составляющей приблизительно 1-1000 мкг/мл, и в соответствии с некоторыми способами приблизительно 25-300 мкг/мл.

В качестве альтернативы, макроциклическое соединение можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, причем в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота введения могут изменяться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактических применениях относительно низкую дозу вводят с относительно длинными интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца своей жизни. При терапевтических применениях относительно высокая доза с относительно короткими интервалами иногда требуется до тех пор, пока развитие заболевания ограничится или прекратится, и предпочтительно до тех пор, пока у пациента не проявится частичное или полное ослабление симптомов заболевания. После этого введение пациенту можно осуществлять по профилактической схеме.

Фактические уровни дозы активных ингредиентов в фармацевтических композициях согласно настоящему раскрытию можно изменять с тем, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, при этом не являясь токсичным для пациента. Выбранный уровень дозы будет зависеть от ряда фармакокинетических факторов, в том числе от активности конкретных используемых композиций согласно настоящему раскрытию или их сложноэфирной, солевой или амидной формы, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в сочетании с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, массы, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза пациента, получающего лечение, и подобных факторов, известных в области медицины.

"Терапевтически эффективная доза" макроциклического соединения согласно настоящему раскрытию предпочтительно приводит в результате к снижению тяжести симптомов заболевания, повышению частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждению ухудшения или инвалидизации, обусловленных поражением заболеванием. Например, для лечения опухолей "терапевтически эффективная доза" лекарственного средства предпочтительно ингибирует рост клеток или опухолевый рост по меньшей мере приблизительно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60% и даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80% в сравнении с субъектами, не получавшими лечение. Способность соединения к ингибированию роста опухоли и/или ВИЧ можно оценить в модельной системе на животном, предсказывающей эффективность в человеческих опухолях или эффективность против вирусов. В качестве альтернативы, это свойство композиции можно оценить посредством исследования способности соединения к ингибированию, такое ингибирование оценивается *in vitro* с помощью анализов, известных практикующему специалисту в данной области техники.

Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшать размер опухоли, снижать вирусную нагрузку или иным образом ослаблять симптомы у субъекта. Специалист в данной области техники будет способен определить такие количества, исходя из таких факторов, как размеры субъекта, тяжесть симптомов у субъекта и конкретные выбранные композиция или путь введения.

В соответствии с еще одним аспектом изобретением предполагается фармацевтический набор, содержащий макроциклическое соединение и другой иммуномодулятор, который описан в данном документе. Набор также может дополнительно содержать инструкции к применению в лечении гиперпролиферативного заболевания (такого как злокачественная опухоль, которая описана в данном документе) и/или вирусного заболевания.

Композицию согласно настоящему раскрытию можно вводить посредством одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких из ряда способов, известных в уровне техники. Как будет понятно специалисту в данной области техники, путь и/или способ введения будет изменяться в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения для макроциклических соединений согласно настоящему раскрытию включают внутривенный, внутримышечный, интрадермальный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например путем инъекции или инфузии. Используемая в данном документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно введение посредством инъекции и включает в себя, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, внутрикожную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

В качестве альтернативы, макроциклические соединения согласно настоящему раскрытию можно вводить посредством непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения можно приготовить с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, как, например, состав с контролируемым высвобождением, в том числе имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этилен-винилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы получения таких составов защищены патентами или являются общеизвестными 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 можно вводить с использованием медицинских устройств, известных в уровне техники. Например, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления терапевтическую композицию согласно настоящему раскрытию можно вводить с использованием безыгольного устройства для подкожной инъекции, такого как устройства, раскрытые в патентах США № 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примеры широко известных имплантатов и модулей, пригодных в настоящем раскрытии, включают в себя патент США № 4487603, в котором раскрыт имплантируемый инфузионный микронасос для дозирования лекарственного препарата с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, в котором раскрыто терапевтическое устройство для введения лекарственных препаратов через кожу; патент США № 4447233, в котором раскрыт инфузионный насос для лекарственного препарата для доставки лекарственного препарата с точной скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором раскрыт имплантируемый инфузионный аппарат, обеспечивающий переменную скорость течения жидкости для непрерывной доставки лекарственного средства; патент США № 4439196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства с многокамерными отсеками; и патент США № 4475196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства. Эти патенты включены в данный документ посредством ссылки. Специалистам в данной области техники известны многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули.

В соответствии с определенными вариантами осуществления макроциклические соединения со-

гласно настоящему раскрытию могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить надлежащее распространение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Для обеспечения пересечения терапевтическими соединениями согласно настоящему раскрытию BBB (если это желательно) их можно составить, например, в липосомах. Относительно способов получения липосом, см., например, патенты США № 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые селективно транспортируются в конкретные клетки или органы, тем самым повышая целенаправленную доставку лекарственного средства (см., например, Ranade V.V., *J. Clin. Pharmacol.*, 29:685 (1989)). Иллюстративные нацеливающие фрагменты включают в себя фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016 за авторством Low et al.); маннозиды (Umezawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 153:1038 (1988)); макроциклы (Bloeman, P.G. et al., *FEBS Lett.*, 357:140 (1995); Owais M. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39:180 (1995)); рецептор сурфактантного белка А (Briscoe et al., *Am. J. Physiol.*, 1233:134 (1995)); p120 (Schreier et al., *J. Biol. Chem.*, 269:9090 (1994)); см. также Keinänen K. et al., *FEBS Lett.*, 346:123 (1994); Killion J.J. et al., *Immunomethods* 4:273 (1994).

Применения и способы согласно изобретению.

Макроциклические соединения, композиции и способы согласно настоящему раскрытию имеют многочисленные применения *in vitro* и *in vivo*, включающие в себя, например, выявление PD-L1 или усиление иммунной реакции посредством блокады PD-L1. Например, эти молекулы можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или субъектам-людям, например, *in vivo*, для усиления иммунитета при ряде ситуаций. Соответственно, в одном аспекте изобретением предполагается способ модификации иммунной реакции у субъекта, предусматривающий введение субъекту макроциклического соединения согласно настоящему раскрытию таким образом, чтобы иммунная реакция у субъекта была модифицированной. Предпочтительно, реакцию усиливают, стимулируют или повышают. В соответствии с другими аспектами макроциклическое соединение может характеризоваться активностью связывания и терапевтической активностью у яванского макака, мыши и/или лесного сурка.

В контексте данного документа термин "субъект", как предполагается, включает в себя человека и отличных от человека животных. Отличные от человека животные включают в себя всех позвоночных, например млекопитающих и позвоночных, отличных от млекопитающих, таких как отличные от человека приматы, овцы, собаки, кошки, коровы, лошади, куры, лесной сурок, амфибий и рептилий, хотя предпочтительными являются млекопитающие, такие как отличные от человека приматы, овцы, собаки, кошки, коровы и лошади. Предпочтительные субъекты включают в себя пациентов-людей, нуждающихся в усилении иммунной реакции. Способы являются особенно подходящими для лечения пациентов-людей с нарушениями, лечение которых можно осуществлять посредством усиления опосредованной Т-клетками иммунной реакции. В соответствии с конкретным вариантом осуществления способы являются особенно подходящими для лечения клеток злокачественной опухоли *in vivo*. Для достижения антиген-специфического усиления иммунитета макроциклические соединения можно вводить вместе с антигеном, представляющим интерес. Если макроциклические соединения для PD-L1 вводят вместе с другим средством, их можно вводить в любом порядке или одновременно.

Настоящим раскрытием дополнительно предполагаются способы выявления наличия антигена PD-L1 человека, лесного сурка, яванского макака и/или мыши в образце или измерения количества антигена PD-L1 человека, лесного сурка, яванского макака и/или мыши, предусматривающие приведение в контакт образца и контрольного образца со стандартным макроциклическим соединением, которое специфично связывается с PD-L1 человека, лесного сурка, яванского макака и/или мыши, в условиях, которые обеспечивают возможность образования комплекса между макроциклом и PD-L1 человека, лесного сурка, яванского макака и/или мыши. Затем выявляют образование комплекса, причем различие в образовании комплекса между образцом по сравнению с контрольным образцом указывает на наличие антигена PD-L1 человека, лесного сурка, яванского макака и/или мыши в образце.

При условии специфичного связывания макроциклических соединений согласно настоящему раскрытию с PD-L1 по сравнению в CD28, ICOS и CTLA-4 макроциклические соединения согласно настоящему раскрытию можно применять для специфичного выявления экспрессии PD-L1 на поверхности клеток, и, более того, их можно применять для очистки PD-L1 посредством иммуоаффинной очистки.

Злокачественная опухоль.

Блокада PD-1 макроциклическими соединениями может усиливать иммунную реакцию на злокачественные клетки у пациента. Лиганд для PD-1, PD-L1, не экспрессируется в нормальных человеческих клетках, но является широко распространенным в ряде человеческих злокачественных опухолей (Dong et al., *Nat. Med.*, 8:787-789 (2002)). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 приводит в результате к снижению количества опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, снижению опосредованной Т-клеточными рецепторами пролиферации и ускользанию клеток злокачественной опухоли от механизмов иммунологического надзора (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)). Угнетение иммунитета может быть обращено посредством 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)). Несмотря на то что предыдущие исследования показали, что пролиферация Т-клеток может восстанавливаться посредством ингибирования взаимодействия PD-1 с PD-L1, не было сообщений о прямом воздействии на рост злокачественной опухоли *in vivo* посредством блокирования взаимодействия PD-1/PD-L1. В соответствии с одним аспектом настоящее раскрытие относится к лечению субъекта *in vivo* с использованием макроциклического соединения, в результате которого ингибируется рост злокачественной опухоли. Макроциклическое соединение можно применять само по себе для ингибирования роста злокачественных опухолей. В качестве альтернативы, макроциклическое соединение можно применять в сочетании с другими иммуногенными средствами, стандартными средствами для лечения злокачественной опухоли или другими макроциклическими соединениями, как описано ниже.

Соответственно, в соответствии с одним вариантом осуществления изобретением предполагается способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества макроциклического соединения.

Предпочтительные злокачественные опухоли, чей рост можно ингибировать с применением макроциклических соединений согласно настоящему раскрытию, включают в себя злокачественные опухоли, как правило, восприимчивые к иммунотерапии. Неограничивающие примеры предпочтительных злокачественных опухолей для лечения включают в себя меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), почечно-клеточную карциному (например, светлоклеточную карциному), злокачественную опухоль предстательной железы (например, гормонорефрактерную аденокарциному предстательной железы и кастрационно-резистентную злокачественную опухоль предстательной железы), злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль толстой и прямой кишки и злокачественную опухоль легкого (например, ороговевающий и неороговевающий немелкоклеточный рак легкого). Кроме того, настоящее раскрытие включает в себя рефрактерные или рецидивирующие злокачественные новообразования, чей рост может ингибироваться с применением макроциклических соединений согласно настоящему раскрытию.

Примеры других злокачественных опухолей, лечение которых можно осуществлять с применением способов согласно настоящему раскрытию, включают в себя злокачественную опухоль кости, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль кожи, злокачественную опухоль головы или шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, злокачественную опухоль матки, злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль толстой кишки, злокачественную опухоль прямой кишки, злокачественную опухоль анальной области, злокачественную опухоль желудка/желудочно-кишечного тракта, злокачественную опухоль яичка, злокачественную опухоль матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль тонкого кишечника, злокачественную опухоль эндокринной системы, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль паращитовидной железы, злокачественную опухоль надпочечника, саркому мягких тканей, злокачественную опухоль мочеиспускательного канала, злокачественную опухоль полового члена, хронические или острые лейкозы, в том числе острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, злокачественное новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидную злокачественную опухоль, плоскоклеточную злокачественную опухоль, Т-клеточную лимфому, злокачественные опухоли, вызванные факторами окружающей среды, в том числе злокачественные опухоли, вызванные асбестом и комбинации указанных злокачественных опухолей. Настоящее раскрытие также является пригодным для лечения метастатических злокачественных опухолей, в особенности метастатических злокачественных опухолей, которые экспрессируют PD-L1 (Iwai et al., *Int. Immunol.*, 17:133-144(2005)).

Необязательно, макроциклические соединения против PD-L1 можно комбинировать с иммуногенным средством, таким как клетки злокачественных опухолей, очищенные опухолевые антигены (в том числе рекомбинантные белки, соединения и углеводные молекулы), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al., *J. Immunol.*, 173:4919-4928 (2004)). Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин, которые можно применять, включают в себя пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназы, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (дополнительно обсуждаются ниже).

Было показано, что у людей некоторые опухоли являются иммуногенными, как, например, меланомы. Ожидается, что при росте пороговой величины активации Т-клеток за счет блокады PD-L1 можно ожидать активации реакций на опухоль у хозяина.

Блокада PD-L1, вероятно, является наиболее эффективной в сочетании с протоколом вакцинации. Было разработано много экспериментальных стратегий по вакцинации (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, in DeVita, V. et al., eds., Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition (1997)). В соответствии с одной из этих стратегий вакцину получают с использованием аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что эти клеточные вакцины являются наиболее эффективными, когда опухолевые клетки трансдуцируют для экспрессии GM-CSF. GM-CSF, как было показано, является сильным активатором презентирования антигенов при противоопухолевой вакцинации (Dranoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 3539-3543 (1993)).

Изучение экспрессии генов и паттернов экспрессии большого количества генов в различных опухолях привело к определению так называемых опухолеспецифичных антигенов (Rosenberg S.A., Immunity, 10:281-287 (1999)). Во многих случаях эти опухолеспецифичные антигены представляют собой дифференцированные антигены, экспрессирующиеся в опухолях и в клетке, из которой возникает опухоль, например, меланоцитарные антигены gp100, антигены MAGE и Trp-2. Что более важно, многие из этих антигенов, как было показано, являются мишенями опухолеспецифичных Т-клеток, обнаруживаемых у хозяина. Блокаду PD-L1 можно применять в сочетании с набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессирующихся в опухоли, для того чтобы вызвать иммунную реакцию на эти белки. Эти белки в норме воспринимаются иммунной системой как аутоантигены, и, следовательно, она проявляет к ним толерантность. Опухолевый антиген также может включать в себя белок теломеразы, который необходим для синтеза теломер хромосом и который экспрессируется более чем в 85% злокачественных опухолей человека и лишь в ограниченном количестве соматических тканей (Kim N. et al., Science, 266:2011-2013 (1994)). (Эти соматические ткани можно защитить от атаки со стороны иммунной системы с помощью различных средств). Опухолевый антиген также может представлять собой "неоантигены", экспрессирующиеся в клетках злокачественной опухоли вследствие соматических мутаций, которые изменяют последовательность белка или создают слитые белки из двух неродственных последовательностей (т.е. bcr-abl в филадельфийской хромосоме) или идиотип из В-клеточных опухолей.

Другие противоопухолевые вакцины могут включать в себя белки из вирусов, связанных со злокачественными опухолями человека, таких как вирусы папилломы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус герпеса, ассоциированный с саркомой Капоши (KHSV). Другой формой опухолеспецифичного антигена, который можно применять 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 эти HSP являются высокоэффективными при доставке к антигенпрезентирующим клеткам для того, чтобы вызвать иммунитет к опухоли (Suot R. et al., Science, 269:1585-1588 (1995); Tamura Y. et al., Science, 278:117-120 (1997)).

Дендритные клетки (DC) являются высокоактивными антигенпрезентирующими клетками, которые можно использовать для примирования с целью вызвать антигенспецифичные реакции. DC можно получать *ex vivo* и нагружать различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle F. et al., Nat. Med., 4:328-332 (1998)). DC также можно трансдуцировать с использованием генетических средств для экспрессии этих опухолевых антигенов. Также можно осуществлять непосредственное слияние DC с опухолевыми клетками с целью иммунизации (Kugler A. et al., Nat. Med., 6:332-336 (2000)). В качестве метода вакцинации иммунизацию DC можно эффективно сочетать с блокадой PD-L1 для того, чтобы активировать более сильные противоопухолевые реакции.

Блокаду PD-L1 также можно сочетать со стандартными методами лечения злокачественной опухоли. Блокаду PD-L1 можно эффективно сочетать со схемами химиотерапии. В некоторых случаях представляется возможным снижение дозы вводимого химиотерапевтического реагента (Mokyr M. et al., Cancer Res., 58:5301-5304 (1998)). Примером такой комбинации является макроциклическое соединение в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другим примером таких комбинаций является макроциклическое соединение в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научным обоснованием комбинированного применения блокады PD-L1 и химиотерапии является то, что гибель клеток, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить в результате к повышенным уровням опухолевого антигена в рамках пути презентирования антигена. Другими методами комплексной терапии, которые могут приводить в результате к синергии с блокадой PD-L1 вследствие гибели клеток, являются радиационное облучение, хирургическое вмешательство и выключение эндокринной функции. При каждом из этих протоколов создается источник опухолевого антигена у хозяина. Также с блокадой PD-L1 можно комбинировать ингибиторы ангиогенеза. Ингибирование ангиогенеза ведет к гибели опухолевых клеток, что может представлять опухолевый антиген в пути презентирования антигена у хозяина.

Блокирующие PD-L1 макроциклические соединения также можно применять в комбинации с биспецифичными макроциклами, которые нацеливают экспрессирующие Fc-альфа или Fc-гамма рецептор эффекторные клетки на опухолевые клетки (см., например, патенты США № 5922845 и 5837243). Биспецифичные макроциклы можно применять для целенаправленного воздействия на два отдельных антигена. Например, биспецифичные макроциклы для Fc-рецептора/опухолевого антигена (например, Нег-

2/neu) применялись для направления макрофагов к сайтам опухоли. Такое целенаправленное воздействие может более эффективно активировать опухолеспецифичные реакции. Т-клеточное звено в этих реакциях будет дополняться применением блокады PD-L1. В качестве альтернативы, антиген можно доставлять непосредственно в DC при использовании биспецифичных макроциклов, которые связываются с опухолевым антигеном и маркером клеточной поверхности, специфичным для дендритных клеток.

Опухоли ускользают от иммунологического надзора хозяина посредством обширного ряда механизмов. Многие из этих механизмов можно преодолеть путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммунодепрессивными. Они включают в себя, среди прочих, TGF-бета (Kehrl J. et al., *J. Exp. Med.*, 163:1037-1050 (1986)), IL-10 (Howard M. et al., *Immunology Today*, 13:198-200 (1992)) и Fas-лиганд (Hahne M. et al., *Science*, 274:1363-1365 (1996)). Макроциклические соединения для каждой из этих молекул можно применять в комбинации с соединениями против PD-L1 для противодействия эффектам иммунодепрессивного средства и поддержки иммунных реакций против опухоли у хозяина.

Другие макроциклические соединения, которые можно применять для активации иммунологической реактивности у хозяина можно применять в комбинации с соединениями против PD-L1. Они включают в себя молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентирование антигена. Макроциклические соединения против CD40 способны эффективно замещать хелперную активность Т-клеток (Ridge J. et al., *Nature*, 393:474-478 (1998)), и их можно применять в сочетании с антителами к PD-1 (Ito N. et al., *Immunobiology*, 201(5):527-540 (2000)). Активирующие макроциклические соединения для Т-клеточных костимулирующих молекул, таких 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)), также могут обеспечивать повышенные уровни активации Т-клеток.

В настоящее время трансплантацию костного мозга применяют для лечения ряда опухолей гемопоэтического происхождения. Несмотря на то что следствием этого лечения является реакция "трансплантат против хозяина", можно получить терапевтическую выгоду из реакций "трансплантат против опухоли". Блокаду PD-L1 можно применять для повышения эффективности пересаженных от донора опухолеспецифичных Т-клеток.

Также существует несколько экспериментальных лечебных протоколов, которые включают *ex vivo* активацию и разрачивание антигенспецифичных Т-клеток, а также адоптивный перенос этих клеток реципиентам с целью получения антигенспецифичных Т-клеток против опухоли (Greenberg R. et al., *Science*, 285:546-551 (1999)). Эти способы также можно применять для активации Т-клеточных реакций в отношении инфекционных агентов, таких как CMV. *Ex vivo* активация в присутствии макроциклических соединений, как ожидается, может повышать встречаемость и активность подвергнутых адоптивному переносу Т-клеток.

Инфекционные заболевания.

Другие способы согласно настоящему раскрытию применяют для лечения пациентов, которые подверглись воздействию конкретных токсинов или патогенов. Соответственно, еще один аспект настоящего раскрытия предполагает способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, предусматривающий введение субъекту макроциклического соединения согласно настоящему раскрытию, в результате чего осуществляется лечение инфекционного заболевания у субъекта.

Аналогично обсуждаемому выше применению в отношении опухолей блокаду PD-L1 можно применять саму по себе или в качестве адъюванта в комбинации с вакцинами для стимуляции иммунной реакции в отношении патогенов, токсинов и аутоантигенов. Примеры патогенов, в отношении которых данный терапевтический подход может быть особенно полезным, включают в себя патогены, против которых в настоящее время не существует эффективной вакцины, или патогены, против которых традиционные вакцины являются не вполне эффективными. Они включают в себя, без ограничения, ВИЧ, гепатит (А, В и С), грипп, герпес, инфекцию лямблиями, малярию (Butler N.S. et al., *Nature Immunology* 13, 188-195 (2012); Hafalla J.C.R. et al. *PLOS Pathogens*; February 2, 2012)), инфекцию лейшманией, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*. Блокада PD-L1 является особенно полезной против инфекций, вызываемых агентами, такими как ВИЧ, которые презентуют измененные антигены в ходе развития инфекций. Эти новые эпитопы распознаются как чужеродные в момент введения соединения против PD-L1 человека, тем самым провоцируя сильную Т-клеточную реакцию, которая не ослабляется отрицательными сигналами посредством PD-L1.

Некоторые примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению с помощью способов согласно настоящему раскрытию включают в себя 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, коронавирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирус эпидемического паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус осповакцины, HTLV-вирус (Т-лимфотропный вирус человека), вирус денге, папилломавирус, вирус контагиозного моллюска, вирус полиомиелита, вирус бешенства, вирус JC и вирус арбовирусного энцефалита.

Некоторые примеры патогенных бактерий, вызывающий инфекции, поддающиеся лечению с по-

мощью способов согласно настоящему раскрытию, включают в себя хламидию, риккетсии, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и конококки, клебсиеллу, протей, серратину, синегнойную палочку, легионеллу, бактерию-возбудитель дифтерии, сальмонеллу, бациллы, бактерию-возбудитель холеры, бактерию-возбудитель столбняка, бактерию-возбудитель ботулизма, бактерию-возбудитель сибирской язвы, бактерию-возбудитель чумы, бактерию-возбудитель лептоспироза и бактерию-возбудитель болезни Лайма.

Некоторые примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению с помощью способов согласно настоящему раскрытию, включают в себя *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т.д.), рода из семейства *Mucorales* (мукор, абсидия, ризопус), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

Некоторые примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению с помощью способов настоящего раскрытия, включают в себя *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 *Nipposstrongylus brasiliensis*.

Во всех из вышеуказанных способов блокаду PD-L1 можно сочетать с другими формами иммунотерапии, такими как лечение цитокинами (например, интерферонами, средствами, целенаправленно воздействующими на активность VEGF или VEGF-рецепторов, GM-CSF, G-CSF, IL-2), или терапией биспецифичными антителами, которая обеспечивает усиленное презентирование опухолевых антигенов (см., например, Holliger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993); Poljak, Structure, 2:1121-1123 (1994)).

Аутоиммунные реакции.

Макроциклические соединения могут вызывать и усиливать аутоиммунные реакции. В действительности, при индукции противоопухолевых реакций с применением вакцин на основе опухолевых клеток и пептидов выявили, что многие противоопухолевые реакции включают реакции против собственных антигенов (депигментация, наблюдаемая в модифицированной соединением против CTLA-4+GM-CSF B16 меланоме в van Elsas et al. выше; депигментация у вакцинированных Trp-2 мышей (Overwijk W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:2982-2987 (1999)); аутоиммунный простатит, вызываемый вакцинами на основе опухолевых клеток TRAMP (Hurwitz A., выше (2000)), вакцинацию пептидным антигеном меланомы и витилиго, наблюдаемое в клинических испытаниях на людях (Rosenberg S.A. et al., J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol., 19(1):81-84 (1996)).

Таким образом, возможно рассматривать применение блокады против PD-L1 в сочетании с различными собственными белками организма с целью разработки протоколов вакцинации для того, чтобы эффективно вызывать иммунные реакции против этих собственных белков для лечения заболевания. Например, болезнь Альцгеймера включает неадекватное накопление пептида А-бета, в отложениях амилоида в головном мозге; гуморальные иммунные реакции против амилоида способны устранить эти отложения амилоида (Schenk et al., Nature, 400:173-177 (1999)).

В качестве мишеней также можно применять другие собственные белки организма, такие как IgE для лечения аллергии и астмы и TNF-альфа для ревматоидного артрита. Наконец, при применении макроциклов, раскрытых в данном документе, могут индуцироваться гуморальные иммунные реакции в отношении различных гормонов. Гуморальные иммунные реакции с выработкой нейтрализующих антител к половым гормонам можно применять для контрацепции. Гуморальную иммунную реакцию с выработкой нейтрализующих антител к гормонам и другим растворимым факторам, которые требуются для роста конкретных опухолей, также можно рассматривать как возможные цели вакцинации.

Способы, аналогичные описанным выше для применения макроциклов против PD-L1, можно применять для индукции терапевтических аутоиммунных реакций для лечения пациентов с неприемлемым накоплением других аутоантигенов, таких как накопления амилоида, в том числе накопления А-бета при болезни Альцгеймера, цитокинов, таких как TNF-альфа и IgE.

Вакцины.

Макроциклические соединения можно применять для стимуляции антигенспецифичных иммунных реакций посредством совместного введения макроцикла против PD-1 с антигеном, представляющим интерес (например, вакциной). Соответственно, в еще одном аспекте изобретением предполагается способ усиления иммунной реакции на антиген у субъекта, предусматривающий введение субъекту: (i) антигена и (ii) макроцикла против PD-1, в результате чего у субъекта усиливается иммунная реакция на антиген. Антиген может представлять собой, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген из патогена. Неограничивающие примеры таких антигенов включают в себя антигены, обсуждавшиеся в разделах выше, такие как опухолевые антигены (или противоопухолевые вакцины), обсуждаемые выше, или антигены из вирусов, бактерий или других патогенов, описанных выше.

Подходящие пути введения композиций (например, макроциклических соединений, мультиспецифичных и биспецифичных молекул и иммуноконъюгатов) согласно настоящему раскрытию *in vivo* и *in vitro* являются хорошо известными в уровне техники и могут быть выбраны специалистами в данной области техники. Например, композиции можно вводить с помощью инъекции (например, внутривенной

или подкожной). Подходящие дозировки применяемых молекул будут зависеть от возраста и массы субъекта, а также от концентрации и/или состава композиции.

Как описано выше, макроциклические соединения согласно настоящему раскрытию можно вводить совместно с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, например, цитотоксическим средством, радиотоксическим средством или иммунодепрессивным средством. Соединение может быть связано со средством (в виде иммунного комплекса), или его можно вводить отдельно от средства. В последнем случае (отдельное введение) соединение можно вводить перед средством, после него или одновременно с ним или можно вводить совместно с другими известными методами терапии, например, терапии против злокачественных опухолей, например, радиационного облучения. Такие терапевтические средства включают, среди прочих, противоопухолевые средства, такие как доксорубин (адриамин), цисплатин, блеомицин сульфат, кармустин, хлорамбуцил, дакарбазин и циклофосфамид, гидроксимочевина, которые сами по себе эффективны только при уровнях, которые являются токсичными или субтоксичными для пациента. Цисплатин вводят внутривенно в дозе 100 мг/дозу один раз в четыре недели, а адриамин вводят внутривенно в дозе 60-75 мг/мл раз в 21 день. Совместное введение макроциклических соединений согласно настоящему раскрытию с химиотерапевтическими средствами обеспечивает два противораковых средства, действующие посредством разных механизмов, которые приводят к цитотоксическому эффекту в отношении человеческих опухолевых клеток. Такое совместное введение может решить проблемы, обусловленные развитием устойчивости к лекарственным средствам или изменением антигенных свойств опухолевых клеток, которые придают им способность не реагировать с соединением.

Также в объеме изобретения находятся наборы, содержащие композиции согласно настоящему раскрытию (например, макроциклические соединения, биспецифичные или мультиспецифичные молекулы или иммуноконъюгаты) и инструкции к применению. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный реактив или одно или несколько дополнительных дополнительных макроциклических соединений согласно настоящему раскрытию (например, человеческое антитело с дополнительной активностью, которое связывается с эпитопом на антигене PD-L1, отличным от того, с которым связываются макроциклы). Наборы, как правило, включают в себя этикетку, указывающую на предполагаемое применение содержимого набора. Термин этикетка включает в себя любой письменный или записанный материал, поставляемый в наборе или с набором или иным образом сопутствующий набору.

Комплексная терапия.

Комбинирование макроциклических соединений согласно настоящему раскрытию с другим антагонистом PD-L1 и/или другим иммуномодулятором является пригодным для усиления иммунной реакции против гиперпролиферативного заболевания. Например, эти молекулы можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или субъектам-людям, например, *in vivo*, для усиления иммунитета при ряде ситуаций. Соответственно, в одном аспекте изобретением предполагается способ модификации иммунной реакции у субъекта, предусматривающий введение субъекту макроциклического соединения согласно настоящему раскрытию, в результате чего иммунная реакция у субъекта модифицируется. Предпочтительно, реакцию усиливают, стимулируют или повышают. В соответствии с другим вариантом осуществления изобретением предполагается способ изменения неблагоприятных явлений, ассоциированных с лечением гиперпролиферативного заболевания с использованием иммуностимулирующего терапевтического средства, предусматривающий введение субъекту макроциклического соединения согласно настоящему раскрытию и субтерапевтической дозы другого иммуномодулятора.

Блокада PD-L1 макроциклическими соединениями может усиливать иммунную реакцию на злокачественные клетки у пациента. Злокачественные опухоли, чей рост можно ингибировать с применением макроциклических соединений согласно настоящему раскрытию, включают в себя злокачественные опухоли, как правило, восприимчивые к иммунотерапии. Типичные примеры злокачественных опухолей для лечения с использованием комплексной терапии согласно настоящему раскрытию включают в себя меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль предстательной железы, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль толстой кишки и злокачественную опухоль легкого. Примеры других злокачественных опухолей, лечение которых можно осуществлять с применением способов согласно настоящему раскрытию, включают в себя злокачественную опухоль кости, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль кожи, злокачественную опухоль головы или шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, злокачественную опухоль матки, злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль прямой кишки, злокачественную опухоль анальной области, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль яичка, злокачественную опухоль матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль тонкого кишечника, злокачественную опухоль эндокринной системы, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль парашитовидной железы, злокачественную опухоль надпочечника, саркому мягких тканей, злокачественную опухоль мочеиспускательного канала, злокачественную опухоль полового члена, хронические или острые лейкозы, в том числе острый миелоидный лей-

коз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, злокачественное новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидную злокачественную опухоль, плоскоклеточную злокачественную опухоль, Т-клеточную лимфому, злокачественные опухоли, вызванные факторами окружающей среды, в том числе злокачественные опухоли, вызванные асбестом и комбинации указанных злокачественных опухолей. Изобретение также является пригодным для лечения метастатических злокачественных опухолей.

В соответствии с определенными вариантами осуществления комбинацию терапевтических средств, содержащих по меньшей мере одно макроциклическое соединение, обсуждаемое в данном документе, можно вводить одновременно в виде одной композиции в фармацевтически приемлемом носителе или одновременно в виде отдельных композиций, причем каждое средство можно вводить последовательно. Например, второй иммуномодулятор и макроциклическое соединение согласно настоящему раскрытию можно вводить последовательно, как например, второй иммуномодулятор вводят первым, а макроциклическое соединение - вторым, или макроциклическое соединение вводят первым, а иммуномодулятор - вторым. Более того, если более чем одну дозу в ходе комплексной терапии вводят последовательно, порядок последовательного введения можно сменить на обратный или же сохранять тот же порядок при каждом моменте введения, последовательные введения можно комбинировать с одновременными введениями или любой их комбинацией. Например, первое введение второго иммуномодулятора и макроциклического соединения может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, при этом второй иммуномодулятор вводят первым, а макроциклическое соединение - вторым, и третье введение может быть последовательным, при этом макроциклическое соединение вводят первым, а второй иммуномодулятор - вторым, и т.д. Другой типичный режим дозирования может включать первое введение, которое является последовательным, при этом макроциклическое соединение вводят первым, а второй иммуномодулятор - вторым, а последующие введения могут быть одновременными.

Необязательно, комбинацию макроциклического соединения и второго иммуномодулятора можно дополнительно сочетать с иммуногенным средством, таким как злокачественные клетки, очищенные опухолевые антигены (в том числе рекомбинантные белки, пептиды и углеводные молекулы), клетки, и клетками, трансфицированными генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al., *J. Immunol.*, 173:4919-4928 (2004)). Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин, которые можно применять, включают в себя пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназы, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (дополнительно обсуждаются ниже).

Объединенные макроциклическое соединение против PD-L1 и второй иммуномодулятор можно дополнительно сочетать с протоколом вакцинации. Было разработано много экспериментальных стратегий по вакцинации (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 in DeVita et al., eds., *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Fifth Edition (1997)). В соответствии с одной из этих стратегий вакцину получают с использованием аутологических или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что эти клеточные вакцины являются наиболее эффективными, когда опухолевые клетки трансдуцируют для экспрессии GM-CSF. GM-CSF, как было показано, является сильным активатором презентирования антигенов при противоопухолевой вакцинации (Dranoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3539-3543 (1993)).

Изучение экспрессии генов и паттернов экспрессии большого количества генов в различных опухолях привело к определению так называемых опухолеспецифичных антигенов (Rosenberg, *Immunity*, 10:281-287 (1999)). Во многих случаях эти опухолеспецифичные антигены представляют собой дифференцировочные антигены, экспрессирующиеся в опухолях и в клетке, из которой возникает опухоль, например, меланоцитарные антигены gp100, антигены MAGE и Trp-2. Что более важно, многие из этих антигенов, как было показано, являются мишенями опухолеспецифичных Т-клеток, обнаруживаемых у хозяина. В соответствии с определенными вариантами осуществления объединенные макроциклическое соединение против PD-L1 и второй иммуномодулятор можно применять в сочетании с набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессирующихся в опухоли, для того, чтобы вызвать иммунную реакцию на эти белки. Эти белки в норме воспринимаются иммунной системой как аутоантигены, и, следовательно, она проявляет к ним толерантность. Опухолевый антиген также может включать в себя белок теломеразы, который необходим для синтеза теломер хромосом и который экспрессируется более чем в 85% злокачественных опухолей человека и лишь в ограниченном количестве соматических тканей (Kim et al., *Science*, 266:2011-2013 (1994)). (Эти соматические ткани можно защитить от атаки со стороны иммунной системы с помощью различных средств). Опухолевый антиген также может представлять собой "неоантигены", экспрессирующиеся в клетках злокачественной опухоли вследствие соматических мутаций, которые изменяют последовательность белка или создают слитые белки из двух неродственных

последовательностей (т.е. bcr-abl в филадельфийской хромосоме) или идиотип из В-клеточных опухолей.

Другие противоопухолевые вакцины могут включать в себя белки из вирусов, связанных со злокачественными опухолями человека, таких как вирусы папилломы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус герпеса, ассоциированный с саркомой Капоши (KHSV). Другой формой опухолеспецифичного антигена, который можно использовать в сочетании с блокадой PD-L1 макроциклическим соединением, являются очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные из самой опухолевой ткани. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, и эти HSP являются высокоэффективными при доставке к антигенпрезентирующим клеткам для того, чтобы вызвать иммунитет к опухолю (Suot et al., *Science*, 269:1585-1588 (1995); Tamura et al., *Science*, 278:117-120 (1997)).

Дендритные клетки (DC) являются высокоактивными антигенпрезентирующими клетками, которые можно использовать для примирования с целью вызвать антигенспецифичные реакции. DC можно получать *ex vivo* и нагружать различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle et al., *Nat. Med.*, 4:328-332 (1998)). DC также можно трансдуцировать с использованием генетических средств для экспрессии этих опухолевых антигенов. Также можно осуществлять непосредственное слияние DC с опухолевыми клетками с целью иммунизации (Kugler et al., *Nat. Med.*, 6:332-336 (2000)). В качестве метода вакцинации иммунизацию DC можно дополнительно эффективно сочетать с макроциклическим соединением против PD-L1 и вторым иммуномодулятором для активации более сильных противоопухолевых реакций.

Объединенные макроциклическое соединение против PD-L1 и дополнительный иммуномодулятор также можно дополнительно сочетать со стандартными методами лечения злокачественных опухолей. Например, комбинацию макроциклического соединения и второго иммуномодулятора можно эффективно сочетать с химиотерапевтическими схемами. В этих случаях, как наблюдается в случае комбинации макроциклического соединения и второго иммуномодулятора, представляется возможным снизить дозу другого химиотерапевтического реагента, вводимого с комбинацией согласно настоящему раскрытию (Mokyr et al., *Cancer Res.*, 58:5301-5304 (1998)). Примером такой комбинации является комбинация макроциклического соединения и второго иммуномодулятора, дополнительно присутствующего в комбинации с декарбазином, для лечения меланомы. Другим примером является комбинация макроциклического соединения и второго иммуномодулирующего средства, дополнительно присутствующего в комбинации с интерлейкином 2 (IL-2), для лечения меланомы. Научным обоснованием комбинированного применения макроциклического соединения против PD-L1 и другого иммуномодулятора с химиотерапией является то, что гибель клеток, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить в результате к повышенным уровням опухолевого антигена в рамках пути презентирования антигена. Другими методами комплексной терапии, которые могут приводить в результате к синергии с комбинированными макроциклическим соединением против PD-L1 и дополнительным иммуномодулятором вследствие гибели клеток, включают в себя радиационное облучение, хирургическое вмешательство или выключение эндокринной функции. При каждом из этих протоколов создается источник опухолевого антигена у хозяина. Также с комбинированными соединением против PD-L1 и вторым иммуномодулятором можно сочетать ингибиторы ангиогенеза. Ингибирование ангиогенеза ведет к гибели опухолевых клеток, которые также могут быть источником опухолевого антигена, подлежащего направлению в пути презентирования антигена у хозяина.

Комбинацию PD-L1 и другого иммуномодулятора также можно применять в сочетании с биспецифичными макроциклами, которые целенаправленно воздействуют на Fc-альфа или Fc-гамма. Экспрессирующие рецептор эффекторные клетки против опухолевых клеток (см., например, патенты США № 5922845 и 5837243). Биспецифичные макроциклы можно применять для целенаправленного воздействия на два отдельных антигена. Например, биспецифичные макроциклы для Fc-рецептора/опухолевого антигена (например, Her-2/neu) применялись для направления макрофагов к сайтам опухоли. Такое целенаправленное воздействие может более эффективно активировать опухолеспецифичные реакции. Т-клеточное звено в этих реакциях будет дополняться применением объединенного PD-L1 и второго иммуномодулятора. В качестве альтернативы, антиген можно доставлять непосредственно в DC при использовании биспецифичных макроциклов, которые связываются с опухолевым антигеном и маркером клеточной поверхности, специфичным для дендритных клеток.

В соответствии с другим вариантом осуществления комбинацию макроциклического соединения и второго иммуномодулятора можно применять в сочетании с антинеопластическими макроциклическими средствами, такими как RITUXAN® (ритуксимаб), HERCEPTIN® (трастузумаб), BEXXAR® (тоситумомаб), ZEVALIN® (ибритумомаб), CAMPATH® (алемтузумаб), лимфоцид (эпртузумаб), AVASTIN® (бевацизумаб) и TARCEVA® (эрлотиниб) и т.п. В качестве примера, и не вдаваясь в теорию, лечение использованием антитела к злокачественной опухоли или антитела к злокачественной опухоли, конъюгированного с токсином, может вести к гибели клеток злокачественной опухоли (например, опухолевых клеток), которая будет усиливать иммунную реакцию, опосредованную мишенью второго иммуномодулятора или PD-L1. В соответствии с иллюстративным вариантом осуществления лечение гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли) может включать в себя антитело против

злокачественной опухоли в сочетании с макроциклическим соединением и вторым иммуномодулятором, вводимыми одновременно или последовательно, или любую их комбинацию, которая может усиливать противоопухолевые иммунные реакции у хозяина.

Опухоли ускользают от иммунологического надзора хозяина посредством обширного ряда механизмов. Многие из этих механизмов можно преодолеть путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммунодепрессивными. Они включают в себя, среди прочих, TGF-бета (Kehrl J. et al., *J. Exp. Med.*, 163:1037-1050 (1986)), IL-10 (Howard M. et al., *Immunology Today*, 13:198-200 (1992)) и Fas-лиганд (Hahne M. et al., *Science*, 274:1363-1365 (1996)). В еще одном примере антитела к каждой из этих молекул можно дополнительно сочетать с макроциклическим соединением и другим иммуномодулятором для противодействия эффектам иммунодепрессивных средств и благоприятствования противоопухолевым иммунным реакциям у хозяина.

Другие средства, которые можно применять для активации иммунологической реактивности у хозяина, можно также применять в комбинации с макроциклическим соединением согласно настоящему раскрытию. Они включают в себя молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентирование антигена. Макроциклические пептиды против CD40 способны эффективно замещать хелперную активность Т-клеток (Ridge J. et al., *Nature*, 393:474-478 (1998)), и их можно применять в сочетании с макроциклическими соединениями согласно настоящему раскрытию либо отдельно, либо в сочетании с комбинацией, направленной против CTLA-4 (Ito N. et al., *Immunobiology*, 201(5):527-540 (2000)). Активирующие макроциклические соединения для Т-клеточных костимулирующих молекул, таких 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)), также могут обеспечивать повышенные уровни активации Т-клеток.

В настоящее время трансплантацию костного мозга применяют для лечения ряда опухолей гемопоэтического происхождения. Несмотря на то что следствием этого лечения является реакция "трансплантат против хозяина", можно получить терапевтическую выгоду из реакций "трансплантат против опухоли". Макроциклическое соединение согласно настоящему раскрытию, либо отдельно, либо в комбинации с другим иммуномодулятором, можно применять для повышения эффективности пересаживаемых от донора опухолеспецифичных Т-клеток.

Также существует несколько экспериментальных лечебных протоколов, которые включают *ex vivo* активацию и разрачивание антигенспецифичных Т-клеток, а также адоптивный перенос этих клеток реципиентам с целью получения антигенспецифичных Т-клеток против опухоли (Greenberg R. et al., *Science*, 285:546-551 (1999)). Эти способы также можно применять для активации Т-клеточных реакций в отношении инфекционных агентов, таких как CMV. *Ex vivo* активация в присутствии макроциклического соединения согласно настоящему раскрытию, либо отдельно, либо в сочетании с другим иммуномодулятором, как можно ожидать, повышает частоту и активность подвергнутых адоптивному переносу Т-клеток.

В соответствии с определенными вариантами осуществления изобретением предполагается способ изменения неблагоприятного явления, ассоциированного с лечением гиперпролиферативного заболевания с использованием иммуностимулирующего средства, предусматривающий введение субъекту макроциклического соединения согласно настоящему раскрытию в комбинации с субтерапевтической дозой другого иммуномодулятора. Например, способы согласно настоящему раскрытию предполагают способ снижения частоты возникновения колита или диареи, вызванных иммуностимулирующим терапевтическим антителом, посредством введения пациенту непоглощаемого стероида. Вследствие того что любой пациент, который будет получать иммуностимулирующее терапевтическое антитело, имеет риск развития колита или диареи при таком лечении, вся эта популяция пациентов является подходящей для терапии в соответствии со способами согласно настоящему раскрытию. Несмотря на то что стероиды вводили для лечения воспалительного заболевания кишечника (IBD) и предупреждения обострения IBD, их не применяли для предупреждения (снижения частоты возникновения) IBD у пациентов, у которых не было диагностировано IBD. Значительные побочные эффекты, связанные со стероидами, даже непоглощаемыми стероидами, препятствуют их профилактическому применению.

В соответствии с дополнительными вариантами осуществления макроциклические соединения согласно настоящему раскрытию либо отдельно, либо в комбинации с другим иммуномодулятором, можно дополнительно сочетать с применением любого непоглощаемого стероида. В контексте данного документа, "непоглощаемый стероид" представляет собой глюкокортикоид, для которого проявляется значительный пресистемный метаболизм таким образом, что после метаболизма в печени биодоступность стероида является низкой, т.е. составляет менее приблизительно 20%. В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего раскрытия непоглощаемый стероид представляет собой будесонид. Будесонид является локально действующим глюкокортикостероидом, который значительно метаболизируется, преимущественно печенью, после перорального введения. ENTOCORT® EC (Astra-Zeneca) представляет собой pH-зависимый и зависимый от времени пероральный состав будесонида, разработанный для оптимизации доставки лекарственного средства в подвздошную кишку и по толстой кишке. ENTOCORT® EC

одобрен в США для лечения болезни Крона со степенью тяжести от легкой до умеренной, затрагивающей подвздошную кишку и/или восходящую ободочную кишку. Обычная пероральная доза ENTOCORT® ЕС для лечения болезни Крона составляет 6-9 мг/сутки. ENTOCORT® ЕС высвобождается в кишечнике до поглощения и удерживается в слизистой кишки. После того как он проходит через являющуюся мишенью ткань слизистой кишки, ENTOCORT® ЕС значительно метаболизируется системой цитохрома P450 в печени в метаболиты с пренебрежимо малой глюкокортикоидной активностью. Вследствие этого биодоступность является низкой (приблизительно 10%). Низкая биодоступность будесонида приводит в результате к улучшенному терапевтическому индексу по сравнению с другими глюкокортикоидами с менее значительным пресистемным метаболизмом. Будесонид приводит в результате к меньшим неблагоприятным эффектам, в том числе меньшему подавлению гипоталамо-гипофизарной системы, чем системно действующие кортикостероиды. Тем не менее, хроническое введение ENTOCORT® ЕС может приводить в результате к системным эффектам глюкокортикоидов, таким как гиперкортицизм и адrenaльная супрессия. См. Physicians' Desk Reference Supplement, 58th Edition, 608-610 (2004).

В соответствии с дополнительными вариантами осуществления комбинацию PD-L1 и другого иммуномодулятора в сочетании с непоглощаемым стероидом можно дополнительно комбинировать с салицилатом. Салицилаты включают в себя 5-ASA средства, такие как, например, сульфасалазин (AZULFIDINE®, Pharmacia & Upjohn); олсалазин (DIPENTUM®, Pharmacia & Upjohn); балсалазид (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.) и месаламин (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

Дозировка и состав.

Подходящее соединение формулы I или, более конкретно, макроциклическое соединение, описанное в данном документе, можно вводить пациентам для лечения диабета и других связанных заболеваний, при этом соединение присутствует отдельно и/или смешанным с приемлемым носителем в форме фармацевтических составов. Специалисты в области лечения диабета могут легко определить дозу и путь введения соединения млекопитающим, в том числе людям, нуждающимся в таком лечении. Путь введения может включать в себя, без ограничения, пероральное, интраоральное, ректальное, трансдермальное, буккальное, интраназальное, легочное, подкожное, внутримышечное, интрадермальное, подъязычное, введение внутрь толстой кишки, внутриглазное, внутривенное введение или введение в кишечник. Соединение составляют в соответствии с путем введения, исходя из приемлемой фармацевтической 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 соединений, описанных в данном документе, можно вводить в нескольких лекарственных формах, таких как таблетки, капсулы (каждая из которых включает в себя составы с замедленным высвобождением или с регулируемым по времени высвобождением), пилюли, порошки, гранулы, эликсиры, in situ гели, микросферы, кристаллические комплексы, липосомы, микроэмульсии, настойки, суспензии, сиропы, распыляемые аэрозоли и эмульсии. Композиции, описанные в данном документе, также можно вводить в пероральной, внутривенной (в форме струйной инъекции или инфузии), внутрибрюшинной, подкожной, трансдермальной или внутримышечной форме, при этом все применяемые лекарственные формы являются хорошо известными среднему специалисту в области фармацевтики. Композиции можно вводить отдельно, но обычно их будут вводить с фармацевтическим носителем, выбранным на основании выбранного пути введения и стандартной фармацевтической практики.

Схема дозирования для композиций, описанных в данном документе, естественно, будет варьировать в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические характеристики конкретного средства, а также способа и пути его введения; вида, возраста, пола, состояния здоровья, медицинских показаний и массы реципиента; природы и степени выраженности симптомов; вида одновременно осуществляемого лечения; частоты лечения; пути введения, функции почек и печени у пациента и желаемого эффекта. Лечащий врач или ветеринар может определить и назначить эффективное количество лекарственного средства, требующееся для предупреждения, противодействия или задержки развития болезненного состояния.

В качестве общих рекомендаций суточная пероральная доза активного ингредиента при применении к указанным эффектам будет находиться в диапазоне приблизительно от 0,001 до 1000 мг/кг массы тела, предпочтительно приблизительно от 0,01 до 100 мг/кг массы тела в сутки и наиболее предпочтительно приблизительно от 0,6 до 20 мг/кг/сутки. При внутривенном введении суточная доза активного ингредиента при применении к указанным эффектам будет находиться в диапазоне от 0,001 до 100,0 нг в минуту на кг массы тела во время инфузии с постоянной скоростью. Такую продолжительную внутривенную инфузию предпочтительно можно вводить со скоростью, составляющей от 0,01 до 50 нг в минуту на кг массы тела и, наиболее предпочтительно, от 0,01 нг до 10,0 мг в минуту на кг массы тела. Композиции, описанные в данном документе, можно вводить в виде одной суточной дозы, или общую суточную дозу можно вводить в виде разделенных доз два, три или четыре раза в сутки. Композиции, описанные в данном документе, также можно вводить в виде депо-составов, которые будут обеспечивать

замедленное высвобождение лекарственного средства в течение периода порядка суток/недель/месяцев, если желательно.

Композиции, описанные в документе, можно вводить в интраназальной форме посредством местного применения подходящих интраназальных сред или через трансдермальные пути с применением трансдермальных кожных пластырей. При введении в виде системы для трансдермальной доставки введение дозы, конечно, будет продолжительным, а не периодическим в соответствии со схемой дозирования.

Композиции, как правило, вводят в смеси с подходящими фармацевтическими разбавителями, вспомогательными веществами или носителями (собираательно называемыми в данном документе фармацевтическими носителями), подходящим образом выбранными с учетом предполагаемой формы введения, т.е. пероральных таблеток, капсул, эликсиров, распыляемых аэрозолей, получаемых с газом-вытеснителем или без него, и сиропов, и соответствующими общепринятым фармацевтическим практикам.

Например, в случае перорального введения в виде таблетки или капсулы активный компонент лекарственного средства может быть объединен с пероральным нетоксичным фармацевтически приемлемым инертным носителем, таким как, без ограничения, лактоза, крахмал, сахароза, глюкоза, метилцеллюлоза, стеарат магния, фосфат дикальция, сульфат кальция, маннит и сорбит; в случае перорального введения в жидком виде компоненты перорального лекарственного средства могут быть объединены с любым пероральным нетоксичным фармацевтически приемлемым инертным носителем, таким как, без ограничения, этанол, глицерин и вода. Более того, если это желательно или необходимо, подходящие связующие, смазывающие, разрыхляющие средства и красители также могут быть включены в смесь. Подходящие связующие включают в себя, без ограничения, крахмал, желатин, натуральные сахара, такие как, без ограничения, глюкоза или бета-лактоза, подсластители на основе кукурузы, натуральные и синтетические камеди, такие как аравийская камедь, трагакантовая камедь или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлозу, полиэтиленгликоль и воска. Смазывающие средства, применяемые в этих лекарственных формах, включают в себя олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия и хлорид натрия. Разрыхляющие средства включают в себя, без ограничения, крахмал, метилцеллюлозу, агар, бентонит и ксантановую камедь.

Композиции, описанные в данном документе, также можно вводить в виде систем для доставки на основе смешанных мицелл или липосом, таких как небольшие моноламеллярные везикулы, большие моноламеллярные везикулы и мультисламеллярные везикулы. Липосомы могут быть образованы из ряда фосфолипидов, таких как холестерин, стеариламин или фосфатидилхолины. Усилители проникновения можно добавлять для усиления абсорбции лекарственного средства.

Поскольку пролекарства, как известно, улучшают многочисленные желательные качества фармацевтических средств (т.е. растворимость, биодоступность, производство и т.д.), соединения, описанные в данном документе, можно доставлять в виде пролекарства. Следовательно, объект настоящего изобретения, описанного в данном документе, как предполагается, охватывает пролекарства заявленных в данном документе соединений, способы их доставки и композиции, содержащие их.

Композиции, описанные в данном документе, также можно сочетать с растворимыми полимерами в качестве нацеливаемых носителей лекарственного средства. Такие полимеры могут включать в себя поливинил-пирролидон, пирановый сополимер, полигидроксипропил-метакриламид-фенол, полигидроксипропил-этилспартамидфенол или полиэтиленоксид-полилизин, замещенный пальмитоильными остатками. Более того, композиции, описанные в данном документе, можно сочетать с классом биоразлагаемых полимеров, пригодных в достижении контролируемого высвобождения лекарственного средства, например полимолочной кислотой, полигликолевой кислотой, сополимерами полимолочной кислоты и полигликолевой кислоты, поли-эпсилон-капролактоном, поли-гидроксимасляной кислотой, полиортоэфирами, полиацетатами, полидигидропиранами, полицианоацилатами и сшитыми или амфипатическими блоксополимерами из гидрогелей.

Лекарственные формы (фармацевтические композиции), подходящие для введения, могут содержать от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 500 мг активного ингредиента на единицу дозирования. В этих фармацевтических композициях активный ингредиент обычно будет присутствовать в количестве приблизительно 0,5-95 мас.% на основании общей массы композиции.

Желатиновые капсулы могут содержать активный ингредиент и порошкообразные носители, такие как лактоза, крахмал, производное целлюлозы, стеарат магния и стеариновая кислота. Подобные разбавители можно применять для создания прессованных таблеток. Как таблетки, так и капсулы можно производить в виде продуктов с замедленным высвобождением для обеспечения длительного высвобождения лекарственного препарата за период порядка нескольких часов. Прессованные таблетки могут иметь сахарное покрытие или пленочное покрытие для маскировки любого неприятного вкуса и защиты таблетки от атмосферы или покрытие кишечнорастворимой оболочкой для селективного распада в желудочно-кишечном тракте.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения могут содержать окрашивающие и ароматизирующие средства для повышения приемлемости для пациента.

В целом, вода, подходящее масло, солевой раствор, водные растворы декстрозы (глюкозы) и родственных сахаров и гликолей, таких как пропиленгликоль или полиэтиленгликоли, являются подходящими

носителями для парентеральных растворов. Раствор для парентерального введения предпочтительно содержит водорастворимую соль активного ингредиента, подходящие стабилизирующие средства и, если необходимо, буферные вещества. Средства-антиоксиданты, такие как бисульфит натрия, сульфит натрия или аскорбиновая кислота, либо отдельно, либо в сочетании, являются подходящими стабилизирующими средствами. Также применяют лимонную кислоту и ее соли, а также EDTA 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 литературном источнике в этой области.

Типичные пригодные фармацевтические лекарственные формы для введения соединений, описанных в данном документе, могут быть проиллюстрированы следующим образом.

Капсулы.

Большое количество единичных капсул может быть получено посредством заполнения стандартных твердых желатиновых капсул из двух половин 100 мг порошкового активного ингредиента, 150 мг лактозы, 50 мг целлюлозы и 6 мг стеарата магния.

Мягкие желатиновые капсулы.

Смесь активного ингредиента в перевариваемом масле, таком как соевое масло, хлопковое масло или оливковое масло, можно приготовить и впрыскивать с помощью поршневого насоса вытесняющего действия в желатин с образованием мягких желатиновых капсул, содержащих 100 мг активного ингредиента. Капсулы следует промыть и высушить.

Таблетки.

Таблетки можно приготовить с помощью традиционных процедур таким образом, чтобы единица дозировки, например, составляла 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. Соответствующие покрытия можно наносить для повышения вкусовых качеств или задержки абсорбции.

Инъекционный раствор.

Для инъекционного состава композиции соединения, описанной в данном документе, может требоваться или не требоваться применение вспомогательных веществ, таких как те, что были одобрены регуляторными органами. Эти вспомогательные вещества включают в себя, без ограничения, растворители и соразтворители, солюбилизующие, эмульгирующие или загущающие средства, хелатирующие средства, антиоксиданты и восстанавливающие средства, противомикробные консерванты, буферы и средства для коррекции pH, объемообразующие средства, защитные средства и регуляторы тоничности и специальные добавки. Инъекционный состав должен быть стерильным, апиогенным, и, в случае растворов, он не содержит вещества в виде частиц.

Парентеральная композиция, подходящая для введения посредством инъекции, может быть приготовлена посредством перемешивания, например, 1,5 мас.% активного ингредиента в фармацевтически приемлемом буфере, который может содержать или не содержать соразтворитель или другое вспомогательное средство. Раствор следует сделать изотоничным с помощью хлорида натрия и стерилизовать.

Суспензия.

Водную суспензию можно приготовить для перорального и/или парентерального введения таким образом, чтобы, например, каждые 5 мл содержали 100 мг тонко измельченного активного ингредиента, 20 мг карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг бензоата натрия, 1,0 г раствора сорбита, U.S.P., и 0,025 мл ванилина или другого ароматизатора с привлекательным вкусом.

Биоразлагаемые микрочастицы.

Парентеральная композиция с замедленным высвобождением, подходящая для введения посредством инъекции, может быть приготовлена, например, посредством растворения подходящего биоразлагаемого полимера в растворителях, добавления активного средства, подлежащего включению, к раствору полимера и удаления растворителя из матрицы, таким образом образуя матрицу из полимера с активным средством, распределенным по матрице.

Синтез соединения.

Описание настоящего раскрытия в данном документе следует толковать согласованно с законами и принципами химического связывания. Следует понимать, что соединения, охватываемые изобретением, представляют собой те, которые являются в достаточной мере стабильными для применения в качестве фармацевтического средства. Специалисту в данной области техники будет понятно, какие соединения будут стабильными или нестабильными, исходя из общих принципов химического связывания и стабильности.

Химический синтез макроциклического соединения согласно настоящему раскрытию можно осуществлять с применением ряда способов, известных в уровне техники, в том числе поэтапного твердофазного синтеза, частичного синтеза посредством конформационно-облегчаемого повторного лигирования пептидных фрагментов, ферментативного лигирования клонированных или синтетических пептидных фрагментов и химического лигирования. Предпочтительный способ синтеза макроциклических соединений и их аналогов, описанных в данном документе, представляет собой химический синтез с при-

менением различных твердофазных методик, таких как описанные 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 основывается на использовании Fmoc (9-флуоренилметил-метил-оксикарбонил) группы для временной защиты α -аминогруппы в сочетании с трет-бутильной 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).

Соединения можно синтезировать поэтапно на нерастворимой полимерной подложке (также называемой "смолой"), начиная с С-конца соединения. Синтез начинается с присоединения С-концевой аминокислоты соединения к смоле посредством образования амидной или сложноэфирной связи. Это, в конечном итоге, обеспечивает высвобождение полученного в результате соединения в виде С-концевого амида или карбоновой кислоты соответственно.

Требуется, чтобы у С-концевой аминокислоты и всех других аминокислот, применяемых в синтезе, их α -аминогруппы и функциональные группы боковых цепей (если они присутствуют) были дифференциально защищены, в результате чего α -аминозащитная группа может селективно удаляться во время синтеза. Связывание аминокислоты осуществляют посредством активации ее карбоксильной группы в виде активного сложного эфира и осуществления ее реакции с незаблокированной α -аминогруппой N-концевой аминокислоты, прикрепленной к смоле. Последовательность снятия защиты с α -аминогруппы, и связывание повторяют до тех пор, пока не будет собрана последовательность соединения. Соединение затем высвобождается из смолы с одновременным снятием защитной группы с функциональных групп в боковых цепях, обычно в присутствии соответствующих поглотителей для ограничения побочных реакций. Полученное в результате соединение подвергают окончательной очистке с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

В синтезе пептидил-смол, требующихся в качестве предшественников для конечных соединений, используются коммерчески доступные шитые смолы на основе полистирольного полимера (Novabiochem, Сан-Диего, Калифорния; Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния). Предпочтительными твердыми подложками являются 4-(2',4'-диметоксифенил-Фмос-аминометил)феноксиацетил-пара-метилбензидриламинавая смола (амидная MBHA смола Ринка); 9-Фмос-аминоксантен-3-илоксисмола Меррифилда (амидная смола Зиберы); 4-(9-Фмос)аминометил-3,5-диметоксифеноксидвалериламинаметилсмола Меррифилда (PAL смола) для С-концевых карбоксаминов. Связывание первой и последующих аминокислот можно осуществлять с применением HOBt, 6-Cl-HOBt или активных сложных эфиров HOAt, получаемых из DIC/HOBt, HBTU/HOBt, BOP, PyBOP или из DIC/6-Cl-HOBt, HCTU, DIC/HOAt или NATU соответственно. Предпочтительными твердыми подложками являются: 2-хлортритилхлоридная смола и 9-Фмос-аминоксантен-3-илоксисмола Меррифилда (амидная смола Зиберы) для защищенных фрагментов соединения. Загрузка первой аминокислоты на 2-хлортритилхлоридную смолу наилучшим образом достигается посредством осуществления реакции защищенной Фмос аминокислоты со смолой в дихлорметане и DIEA. Если необходимо, небольшое количество DMF можно добавлять для облегчения растворения аминокислоты.

Синтезы аналогов соединения, описанных в данном документе, можно осуществлять посредством применения одно- или многоканального пептидного синтезатора, такого как микроволновый синтезатор CEM Liberty или синтезатор Protein Technologies, Inc. Prelude (6 каналов), Symphony (12 каналов) или Symphony-X (12 или 24 канала).

Предшественники в виде пептидил-смол могут подвергаться расщеплению, и с них может быть снята защитная группа с применением любой стандартной процедуры (см., например, King D.S. et al., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 36:255-266 (1990)). Желательным способом является применение TFA в присутствии воды и TIS в качестве поглотителей радикалов. Как правило, пептидил-смолу перемешивают в смеси TFA/вода/TIS (94:3:3, об.:об.:об.; 1 мл/100 мг пептидил-смолы) в течение 2-6 ч при комнатной температуре. Искользуванную смолу затем фильтруют и раствор в TFA концентрируют или высушивают при пониженном давлении. Полученное в результате неочищенное соединение либо осаждают и промывают Et_2O , либо подвергают повторному растворению непосредственно в DMSO или 50% водном растворе уксусной кислоты для очистки с помощью препаративной ВЭЖХ.

Соединения с желаемой чистотой могут быть получены посредством очистки с применением препаративной ВЭЖХ, например, на жидкостном хроматографе Waters Model 4000 или Shimadzu Model LC-8A. Раствор неочищенного соединения впрыскивают в колонку YMC S5 ODS (20 $\times$ 100 мм) и элюируют с использованием линейного градиента MeCN в воде, при этом оба раствора стабилизированы буфером с 0,1% TFA, при применении скорости потока 14-20 мл/мин, с мониторингом вытекающего потока по оптическому поглощению в УФ-диапазоне при длине волны 220 нм. Структуры очищенных соединений могут быть подтверждены с помощью MS анализа с электрораспылением.

Примеры

Сокращения, используемые в данной заявке, в том числе, в особенности, в следующих иллюстративных схемах и примерах, являются хорошо известными специалистам в данной области техники. Некоторые из применяемых сокращений являются следующими: мин для минут; ч для часов; RT или кТ для комнатной температуры или времени удержания (будет указываться контекстом); насыщ. для насыщенного; TFA для трифторуксусной кислоты; DMF для N,N-диметилформамида; DCM для дихлорметана; Fmoc для 9-флуоренилметилоксикарбонила; HATU для гексафторфосфата (1-[бис(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиния 3-оксида); DIEA или DIPEA для диизопропилэтиламина; NMP для N-метилпирролидона; EDC для 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида; DMSO для диметилсульфоксида; MeOH для метанола; EtOAc для этилацетата; Et₃N для триэтиламина; MeCN или ACN для ацетонитрила; DIAD для диэтилазодикарбоксилата; и TMSI для триметилсилилйодида.

Данные анализа.

Масс-спектрометрия: "ESI-MS(+)" обозначает масс-спектрометрию с ионизацией в режиме электрораспыления, осуществляемую в режиме выявления положительно заряженных ионов; "ESI-MS(-)" обозначает масс-спектрометрию с ионизацией в режиме электрораспыления, осуществляемую в режиме выявления отрицательно заряженных ионов; "ESI-HRMS(+)" обозначает масс-спектрометрию с высокой разрешающей способностью и с ионизацией в режиме электрораспыления, осуществляемую в режиме выявления положительно заряженных ионов; "ESI-HRMS(-)" обозначает масс-спектрометрию с высокой разрешающей способностью и с ионизацией в режиме электрораспыления, осуществляемую в режиме выявления отрицательно заряженных ионов. Выявленные массы приводят, следуя обозначению единиц "m/z". Соединения с точными массами более чем 1000 часто выявляют в виде двухзарядных или трехзарядных ионов.

Следующие протоколы анализа и способы синтеза применяются к примерам 1400-1508.

Данные анализа.

Масс-спектрометрия: "ESI-MS(+)" обозначает масс-спектрометрию с ионизацией в режиме электрораспыления, осуществляемую в режиме выявления положительно заряженных ионов; "ESI-MS(-)" обозначает масс-спектрометрию с ионизацией в режиме электрораспыления, осуществляемую в режиме выявления отрицательно заряженных ионов; "ESI-HRMS(+)" обозначает масс-спектрометрию с высокой разрешающей способностью и с ионизацией в режиме электрораспыления, осуществляемую в режиме выявления положительно заряженных ионов; "ESI-HRMS(-)" обозначает масс-спектрометрию с высокой разрешающей способностью и с ионизацией в режиме электрораспыления, осуществляемую в режиме выявления отрицательно заряженных ионов. Выявленные массы приводят, следуя обозначению единиц "m/z". Соединения с точными массами более чем 1000 часто выявляют в виде двухзарядных или трехзарядных ионов.

Условия A LCMS.

Колонка: BEH C18, 2,1 × 50 мм, частицы с диаметром 1,7 мкм; подвижная фаза A: вода с 0,05% TFA; подвижная фаза B: ацетонитрил с 0,05% TFA; температура: 50°C; градиент: от 2% B к 98% B за 2 мин, затем выдерживание в течение 0,5 мин при 98% B; поток: 0,8 мл/мин; выявление: в УФ при длине волны 220 нм.

Условия B LCMS анализа.

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

Условия C LCMS анализа.

Колонка: BEH C18, 2,1 × 50 мм, частицы с диаметром 1,7 мкм; подвижная фаза A: вода с 0,2% муравьиной кислотой и 0,01% TFA; подвижная фаза B: ацетонитрил с 0,2% муравьиной кислотой и 0,01% TFA; температура: 50°C; градиент: от 2% B к 80% B за 2 мин, от 80% B до 98% B за 0,1 мин, затем выдерживание в течение 0,5 мин в 98% B; поток: 0,8 мл/мин; выявление: в УФ при длине волны 220 нм.

Условия D LCMS анализа.

Колонка: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1 × 50 мм, частицы с диаметром 1,7 мкм; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; температура: 50°C; градиент: 0-100% B за 3 мин, затем выдерживание в течение 0,75 мин в 100% B; поток: 1,11 мл/мин; выявление: в УФ при длине волны 220 нм.

Условия E LCMS анализа.

Колонка: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1 × 50 мм, частицы с диаметром 1,7 мкм; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; температура: 50°C; градиент: 0-100% B за 3 мин, затем выдерживание в течение 0,75 мин в 100% B; поток: 1,11 мл/мин; выявление: в УФ при длине волны 220 нм.

Условия F LCMS анализа.

Колонка: Waters Xbridge C18, 2,1 × 50 мм; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; температура: 35°C;

градиент: 0-100% В за 4 мин, затем выдерживание в течение 1 мин в 100% В; поток: 4 мл/мин; выявление: в УФ при длине волны 220 нм.

Условия G LCMS анализа.

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

Условия H LCMS анализа.

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

Условия I LCMS анализа.

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

Условия A ВЭЖХ анализа.

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

Условия B ВЭЖХ анализа.

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

Условия C ВЭЖХ анализа.

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

Условия D ВЭЖХ анализа.

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

Условия E ВЭЖХ анализа.

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

Условия F ВЭЖХ анализа.

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

Условия G ВЭЖХ анализа.

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

Условия H ВЭЖХ анализа.

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

Условия I ВЭЖХ анализа.

Колонка: Phenomenex Luna 5u C 18(2) 150 × 4,6 мм; подвижная фаза А: вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,1% трифторуксусной кислотой; градиент 5-100% В за 20 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток 1 мл/мин, выявление: в УФ при длине волны 220 нм.

Условия J ВЭЖХ анализа.

Колонка: Phenomenex Luna 5u C 18(2) 150 × 4,6 мм; подвижная фаза А: вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,1% трифторуксусной кислотой; градиент 10-100% В за 20 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток 1 мл/мин, выявление: в УФ при длине вол-

ны 220 нм.

Общие процедуры.

Способ А с применением прибора Prelude.

Все манипуляции осуществляли в условиях автоматизации на синтезаторе пептидов Prelude (Protein Technologies). Все процедуры, если не указано иное, осуществляли в полипропиленовой пробирке объемом 10 или 45 мл, оснащенной фриттой на дне. Пробирка соединяется с синтезатором пептидов Prelude как через дно, так и через верхнюю часть пробирки. DMF и DCM можно добавлять через верхнюю часть пробирки, что обеспечивает одинаковое промывание боковых поверхностей пробирки. Остальные реактивы добавляют через дно пробирки, и их пропускают через фритту для контакта со смолой. Все растворы удаляют через дно пробирки. "Периодическое взбалтывание" описывает короткие импульсы подачи газообразного N_2 через фритту на дне; импульс длится примерно 5 с и происходит каждые 30 с. Растворы аминокислот обычно не использовали по прошествии более трех недель от момента приготовления смолы Зиберы = Fmoc-аминоксантен-3-илокси, где "3-илокси" описывает положение и тип связи с полистирольной смолой. Применяемая смола представляет собой полимер Меррифилда (полистирол) с линкером Зиберы (защищенный Fmoc-группой по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,71 ммоль/г. Обычные применяемые аминокислоты перечислены ниже, причем защитные группы для боковых цепей показаны внутри круглых скобок. 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 из "Способа А с применением прибора Prelude" описывают эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зиберы, связавшегося со смолой. Масштаб соответствует примерно 140 мг смолы Зиберы-Меррифилда, описанной выше. Все процедуры можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. Перед связыванием аминокислоты все последовательности синтеза соединения начинаются с процедуры обеспечения набухания смолы, описанной ниже в разделе "Процедура набухания смолы". Связывание аминокислот с первичным амином на N-конце используется в разделе "Процедура связывания с одной группой", описанном ниже. Связывание Fmoc-N-метиламинокислот и связывание со вторичным амином на N-конце используется в разделе "Процедура связывания со вторичным амином", описанном ниже. Связывание хлорацетильной группы с N-концом соединения описано в разделах "Процедура связывания с хлорацетилхлоридом" или "Процедура связывания с хлоруксусной кислотой", подробно описанных ниже.

Процедура набухания смолы.

В полипропиленовый реакционный сосуд объемом 40 мл для твердофазного синтеза добавляли смолу Меррифилда:Зибера (140 мг, 0,100 ммоль). Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (5,0 мл) и DCM (5,0 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 10 мин до того, как растворитель сливали.

Процедура связывания с одной группой.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно пять раз следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 60 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор аминокислоты и HOAt (0,2М в DMF, 5,0 мл, 10 экв.), затем DIC (0,2М в DMF, 5,0 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 60 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида: DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура связывания со вторичным амином.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно пять раз следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) до-

бавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 60 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор аминокислоты и HOAt (0,2М в DMF, 5,0 мл, 5 экв.), затем DIC (0,2М в DMF, 5,0 мл, 5 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 300 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида:DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура связывания с хлорацетилхлоридом.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно пять раз следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как 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 взбалтывали в течение 12-18 ч, а затем раствор сливали. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли в верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждого промывания DCM (4,0 мл) добавляли в верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали.

Способ В с применением прибора Prelude.

Все манипуляции осуществляли в условиях автоматизации на синтезаторе пептидов Prelude (Protein Technologies). Все процедуры осуществляли в полипропиленовой пробирке объемом 10 или 45 мл, оснащенной фриттой на дне. DMF и DCM можно добавлять через верхнюю часть пробирки, что обеспечивает одинаковое промывание боковых поверхностей пробирки. Остальные реактивы добавляют через дно пробирки, и их пропускают через фритту для контакта со смолой. Все растворы удаляют через дно пробирки. "Периодическое взбалтывание" описывает короткие импульсы подачи газообразного N₂ через фритту на дне; импульс длится примерно 5 с и происходит каждые 30 с. Растворы аминокислот обычно не использовали по прошествии трех недель с момента приготовления. Зибер = Fmoc-аминоксантен-3-илокси, при этом "3-илокси" описывает положение и тип связи с полистирольной смолой. Применяемая смола представляет собой полимер Меррифилда (полистирол) с линкером Зибера (защищенный Fmoc-группой по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,71 ммоль/г. Обычные применяемые аминокислоты перечислены ниже, причем защитные группы для боковых цепей показаны внутри круглых скобок. 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 из "Способа В с применением прибора Prelude" описывают эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зибера, связавшегося со смолой. Масштаб соответствует примерно 140 мг смолы Зибера-Меррифилда, описанной выше. Все процедуры можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. Перед связыванием аминокислоты все последовательности синтеза соединения начинаются с процедуры обеспечения набухания смолы, описанной ниже в разделе "Процедура набухания смолы". Связывание аминокислот с первичным амином на N-конце используется в разделе "Процедура связывания с одной группой", описанном ниже. Связывание аминокислот со вторичным амином на N-конце используется в разделе "Процедура связывания со вторичным амином", описанном ниже. Связывание хлорацетильной группы с N-концом соединения описано в разделах "Процедура связывания с хлорацетилхлоридом" или "Процедура связывания с хлоруксусной кислотой", подробно описанных ниже.

Процедура набухания смолы.

В полипропиленовый реакционный сосуд объемом 40 мл для твердофазного синтеза добавляли смолу Меррифилда:Зибера (140 мг, 0,100 ммоль). Смолу промывали (обеспечивали набухание) три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (5,0 мл) и DCM (5,0 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 10 мин до того, как

последовательно три раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли в верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: CH_2Cl_2 (2,0 мл) добавляли в верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту.

Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно пять раз следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли DMF (2,0 мл), хлоруксусную кислоту (1,2 ммоль, 113 мг, 12 экв.) и N,N'-диизопропилкарбодиимид (1,2 ммоль, 0,187 мл, 12 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 12-18 ч, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли в верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: CH_2Cl_2 (2,0 мл) добавляли в верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту.

Способ С с применением прибора Prelude.

Все манипуляции осуществляли в условиях автоматизации на синтезаторе пептидов Prelude (Protein Technologies). Все процедуры, если не указано иное, осуществляли в полипропиленовой пробирке объемом 10 или 45 мл, оснащенной фриттой на дне. Пробирка соединяется с синтезатором пептидов Prelude как через дно, так и через верхнюю часть пробирки. DMF и DCM можно добавлять через верхнюю часть пробирки, что обеспечивает одинаковое промывание боковых поверхностей пробирки. Остальные реактивы добавляют через дно пробирки, и их пропускают через фритту для контакта со смолой. Все растворы удаляют через дно пробирки. "Периодическое взбалтывание" описывает короткие импульсы подачи газообразного N_2 через фритту на дне; импульс длится примерно 5 с и происходит каждые 30 с. Растворы аминокислот обычно не использовали по прошествии трех недель с момента приготовления. Раствор HATU использовали не позднее 5 суток после приготовления. Зибер = Fmoc-аминоксантен-3-илокси, при этом "3-илокси" описывает положение и тип связи с полистирольной смолой. Применяемая смола представляет собой полимер Меррифилда (полистирол) с линкером Зибера (защищенный Fmoc-группой по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,71 ммоль/г. Обычные применяемые аминокислоты перечислены ниже, причем защитные группы для боковых цепей показаны внутри круглых скобок. 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 из "Способа С с применением прибора Prelude" описывают эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зибера, связавшегося со смолой. Масштаб соответствует примерно 140 мг смолы Зибера-Меррифилда, описанной выше. Все процедуры можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. Перед связыванием аминокислоты все последовательности синтеза соединения начинаются с процедуры обеспечения набухания смолы, описанной ниже в разделе "Процедура набухания смолы". Связывание аминокислот с первичным амином на N-конце используется в разделе "Процедура связывания с одной группой", описанном ниже. Связывание аминокислот со вторичным амином на N-конце используется в разделе "Процедура связывания со вторичным амином", описанном ниже. Окончательное промывание смолы используется в разделе "Процедура окончательного промывания", описанном ниже.

Процедура набухания смолы.

В полипропиленовый реакционный сосуд объемом 40 мл для твердофазного синтеза добавляли смолу Меррифилда:Зибера (140 мг, 0,100 ммоль). Смолу промывали (обеспечивали набухание) три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (5,0 мл) и DCM (5,0 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 10 мин до того, как растворитель сливали через фритту.

Процедура связывания с одной группой.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали

Процедура связывания с хлоруксусной кислотой.

Следует учесть стадию, осуществляемую в ручном режиме. В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь встряхивали при комнатной температуре в течении 5 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно пять раз следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь взбалтывали до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли DMF (2,0 мл), хлоруксусную кислоту (1,2 ммоль, 113 мг, 12 экв.) и N,N'-диизопропилкарбодиимид (1,2 ммоль, 0,187 мл, 12 экв.). Смесь встряхивали при комнатной температуре в течении 12-18 ч, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли в верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: CH₂Cl₂ (4,0 мл) добавляли в верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту.

Способ D с применением прибора Prelude.

Все манипуляции осуществляли в условиях автоматизации на синтезаторе пептидов Prelude (Protein Technologies). Все процедуры, если не указано иное, осуществляли в полипропиленовой пробирке объемом 10 или 45 мл, оснащенной фриттой на дне. Пробирка соединяется с синтезатором пептидов Prelude как через дно, так и через верхнюю часть пробирки. DMF и DCM можно добавлять через верхнюю часть пробирки, что обеспечивает одинаковое промывание боковых поверхностей пробирки. Остальные реактивы добавляют через дно пробирки, и их пропускают через фритту для контакта со смолой. Все растворы удаляют через дно пробирки. "Периодическое взбалтывание" описывает короткие импульсы подачи газообразного N₂ через фритту на дне; импульс длится примерно 5 с и происходит каждые 30 с. Растворы аминокислот обычно не использовали по прошествии трех недель с момента приготовления. Раствор HATU использовали не позднее 5 суток после приготовления. Зибер = Fmoc-аминоксантен-3-илокси, при этом "3-илокси" описывает положение и тип связи с полистирольной смолой. Применяемая смола представляет собой полимер Меррифилда (полистирол) с линкером Зибера (защищенный Fmoc-группой по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,71 ммоль/г. Обычные применяемые аминокислоты перечислены ниже, причем защитные группы для боковых цепей показаны внутри круглых скобок. 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 из "Способа D с применением прибора Prelude" описывают эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зибера, связанного со смолой. Масштаб соответствует примерно 140 мг смолы Зибера-Меррифилда, описанной выше. Все процедуры можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. Перед связыванием аминокислоты все последовательности синтеза соединения начинаются с процедуры обеспечения набухания смолы, описанной ниже в разделе "Процедура набухания смолы". Связывание аминокислот с первичным амином на N-конце используется в разделе "Процедура связывания с одной группой", описанном ниже. Связывание аминокислот со вторичным амином на N-конце используется в разделе "Процедура связывания со вторичным амином", описанном ниже. Окончательное промывание смолы используется в разделе "Процедура окончательного промывания", описанном ниже.

Процедура набухания смолы.

В полипропиленовый реакционный сосуд объемом 40 мл для твердофазного синтеза добавляли смолу Меррифилда:Зибера (140 мг, 0,100 ммоль). Смолу промывали (обеспечивали набухание) три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (5,0 мл) и DCM (5,0 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 10 мин до того, как растворитель сливали через фритту.

Процедура связывания с одной группой.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно пять раз следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 60 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2M в DMF, 1,25 мл, 2,5 экв.), затем HATU (0,2M в DMF, 1,25 мл, 2,5 экв.) и, наконец, DIPEA (0,8M в DMF, 0,75 мл, 5 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 30 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждого промывания

DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида:DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 15 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура связывания со вторичным амином.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно пять раз следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2M в DMF, 1,25 мл, 2,5 экв.), затем HATU (0,2M в DMF, 1,25 мл, 2,5 экв.) и, наконец, DIPEA (0,8M в DMF, 0,75 мл, 5 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 30 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали два раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли амина (0,2M в DMF, 1,25 мл, 2,5 экв.), затем HATU (0,2M в DMF, 1,25 мл, 2,5 экв.) и, наконец, DIPEA (0,8M в DMF, 0,75 мл, 5 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 30 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали два раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида:DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 15 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали два раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида:DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 15 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура окончательного промывания.

Смолу промывали последовательно два раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждого промывания DCM (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура связывания с хлоруксусной кислотой.

Следует учесть стадию, осуществляемую в ручном режиме. В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь встряхивали при комнатной температуре в течении 5 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно пять раз следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь взбалтывали до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли DMF (2,0 мл), хлоруксусную кислоту (1,2 ммоль, 113 мг, 12 экв.) и N,N'-диизопропилкарбодиимид (1,2 ммоль, 0,187 мл, 12 экв.). Смесь встряхивали при комнатной температуре в течении 12-18 ч, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли в верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: CH₂Cl₂ (4,0 мл) добавляли в верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту.

Способ А с применением прибора СЕМ.

Все манипуляции осуществляли в условиях автоматизации на микроволновом синтезаторе пептидов СЕМ Liberty (СЕМ Corporation). Все процедуры, если не указано иное, осуществляли в полипропиленовой пробирке объемом 30 или 125 мл, соединенной через фритту на дне с микроволновым блоком СЕМ Discovery. Пробирка соединяется с синтезатором СЕМ Liberty как через дно, так и через верхнюю часть пробирки. DMF и DCM можно добавлять через верхнюю часть пробирки и через ее дно, что обеспечивает одинаковое промывание боковых поверхностей пробирки. Все растворы удаляют через дно

пробирки, за исключением переноса смолы из верхней части. "Периодическое барботирование" описывает краткое барботирование газообразным N_2 через находящуюся на дне фритту. Растворы аминокислот обычно не использовали по прошествии трех недель с момента приготовления. Раствор HATU использовали не позднее 5 суток после приготовления. DMF - диметилформамид; HCTU - 2-(6-хлор-1-Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионий; HATU - гексафторфосфат 1-[бис(диметиламино)метиле]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиния-3-оксида; DIPEA - диизопропилэтиламин; Зибер = Fmoc-аминоксантен-3-илокси, при этом "3-илокси" описывает положение и тип связи с полистирольной смолой. Применяемая смола представляет собой полимер Меррифилда (полистирол) с линкером Зибера (защищенный Fmoc-группой по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,71 ммоль/г. В синтезе можно использовать другие обычно применяемые смолы, такие как смола Ринка, хлортритильная смола, или другие чувствительные к кислотной среде линкеры, амидную смолу Зибера применяют в случае, если иное не указывается в конкретных примерах. Обычные применяемые аминокислоты перечислены ниже, причем защитные группы для боковых цепей показаны внутри круглых скобок. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Orn(Boc)-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Процедуры из "Способа А с применением прибора СЕМ" описывают эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зибера, связавшегося со смолой. Масштаб соответствует примерно 140 мг смолы Зибера-Меррифилда, описанной выше. Все процедуры можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. Перед связыванием аминокислоты все последовательности синтеза соединения начинаются с процедуры обеспечения набухания смолы, описанной ниже в разделе "Процедура набухания смолы". Связывание аминокислот с первичным амином на N-конце используется в разделе "Процедура связывания с одной группой", описанном ниже. Связывание аминокислот со вторичным амином на N-конце используется в разделе "Процедура связывания со вторичным амином", описанном ниже. Связывание хлорацетильной группы с N-концом соединения описано в разделах "Процедура связывания с хлорацетилхлоридом" или "Процедура связывания с хлоруксусной кислотой", подробно описанных выше.

Процедура набухания смолы.

В полипропиленовую коническую пробирку объемом 50 мл добавляли смолу Меррифилда:Зибера (140 мг, 0,100 ммоль). Затем DMF (7 мл) добавляли в пробирку с последующим добавлением DCM (7 мл). Смолу затем переносили в реакционный сосуд из верхней части сосуда. Процедуру дополнительно повторяют два раза. Добавляли DMF (7 мл) с последующим добавлением DCM (7 мл). Смолу давали набухнуть при барботировании N_2 со дна реакционного сосуда в течение 15 мин до того, как растворитель сливали через фритту.

Стандартная процедура связывания.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно и, наконец, промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 2,5 мл, 5 экв.), HATU (0,5М в DMF, 1,0 мл, 5 экв.) и DIPEA (2М в NMP, 0,5 мл, 10 экв.). Смесь перемешивали посредством барботирования N_2 в течение 5 мин при 75°C для всех аминокислот, за исключением Fmoc-Cys(Trt)-OH и Fmoc-His(Trt)-OH, связывание которых осуществляли при 50°C, реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно и, наконец, промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть. 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: промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно и, наконец, промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура двойного связывания с двумя группами.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали

вали последовательно три раза следующим образом: промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно и, наконец, промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 2,5 мл, 5 экв.), HATU (0,5М в DMF, 1,0 мл, 5 экв.) и DIPEA (2М в NMP, 0,5 мл, 10 экв.). Смесь перемешивали посредством барботирования N_2 в течение 5 мин при 75°C для всех аминокислот, за исключением Fmoc-Cys(Trt)-ОН и Fmoc-His(Trt)-ОН, связывание которых осуществляли при 50°C, реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно и, наконец, промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 2,5 мл, 5 экв.), HATU (0,5М в DMF, 1,0 мл, 5 экв.) и DIPEA (2М в NMP, 0,5 мл, 10 экв.). Смесь перемешивали посредством барботирования N_2 в течение 5 мин при 75°C для всех аминокислот, за исключением Fmoc-Cys(Trt)-ОН и Fmoc-His(Trt)-ОН, связывание которых осуществляли при 50°C, реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно и, наконец, промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть. 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: промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно и, наконец, промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура связывания со вторичным амином.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли раствор 5% пиперазина и 0,1М HOBt в DMF (7 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин при 75°C, а затем раствор сливали. Эту процедуру повторяли еще раз. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно и, наконец, промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 2,5 мл, 5 экв.), HCTU (0,5М в DMF, 1,0 мл, 5 экв.) и DIPEA (2М в NMP, 0,5 мл, 10 экв.). Смесь перемешивали посредством барботирования N_2 в течение 5 минут при 75°C для всех аминокислот (50°C для Fmoc-Cys(Trt)-ОН и Fmoc-His(Trt)-ОН), за этим следовали 6 ч без нагревания. После фильтрования смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно и, наконец, промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть. 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. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно и, наконец, промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура связывания со специальными аминокислотами.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно и, наконец, промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть. В реакционный сосуд добавляли раствор аминокислоты (от 1,25 мл до 5 мл, от 2,5 экв. до 10 экв.), содержащий HATU (от 2,5 экв. до 10 экв.) и, наконец, DIPEA (2М в NMP, от 0,5 мл до 1 мл, 20 экв.). Смесь перемешивали посредством барботирования N_2 в течение периода 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: Промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно и, наконец, промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть. 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: Промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть с последующим промыванием DMF (7 мл) через дно и, наконец, промывание DMF (7 мл) осуществляли через верхнюю часть. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Способ А с применением прибора Symphony.

Все манипуляции осуществляли в условиях автоматизации на синтезаторе пептидов Symphony (Protein Technologies). Все процедуры, если не указано иное, осуществляли в полипропиленовой пробирке Symphony, оснащенной фриттой на дне. Пробирка соединяется с синтезатором пептидов Symphony как

через дно, так и через верхнюю часть пробирки. Все растворители, DMF, DCM, аминокислоты и реактивы добавляют через дно пробирки, и их пропускают через фритту для контакта со смолой. Все растворы удаляют через дно пробирки. "Периодическое взбалтывание" описывает короткие импульсы подачи газообразного N_2 через фритту на дне; импульс длится примерно 5 с и происходит каждые 15 с. Растворы аминокислот обычно не использовали по прошествии трех недель с момента приготовления. Раствор HATU использовали не позднее 5 суток после приготовления. DMF - диметилформамид; HCTU - 2-(6-хлор-1-Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний; HATU - гексафторфосфат 1-[бис(диметиламино)метил]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиния-3-оксида; NMM - *p*-метилморфолин; DIPEA - диизопропилэтиламин; Зибер - Fmoc-аминоксантилен-3-илокси, при этом "3-илокси" описывает положение и тип связи с полистирольной смолой. Применяемая смола представляет собой полимер Меррифилда (полистирол) с линкером Зибера (защищенный Fmoc-группой по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,71 ммоль/г. Также в синтезе можно применять другие обычно применяемые чувствительные к кислотной среде смолы, такие как смола Ринка или функционализированная хлортритильная смола. Обычные применяемые аминокислоты перечислены ниже, причем защитные группы для боковых цепей показаны внутри круглых скобок. 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 из "Способа А с применением прибора Symphony" описывают эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,050 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зибера, связавшегося со смолой. Масштаб соответствует примерно 70 мг смолы Зибера-Меррифилда, описанной выше. Все процедуры можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,050 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. Перед связыванием аминокислоты все последовательности синтеза соединения начинаются с процедуры обеспечения набухания смолы, описанной ниже в разделе "Процедура набухания". Связывание аминокислот с первичным амином на N-конце используется в разделе "Стандартная процедура связывания", описанном ниже. При связывании аминокислот со вторичным амином на N-конце, применяемом при "двойном связывании", связывание специальных аминокислот обеспечивают посредством ручного присоединения "пустой" аминокислоты при "связывании 'пустой' аминокислоты", описанном ниже.

Процедура набухания.

В полипропиленовый реакционный сосуд объемом для твердофазного синтеза с помощью прибора Symphony добавляли смолу Меррифилда:Зибера (70 мг, 0,050 ммоль). Смолу промывали (обеспечивали набухание) три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 10 минут до того, как растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 2,5 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и, наконец, NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали DMF (6,25 мл), добавляемым через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и, наконец, NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 30 с до того, как растворитель сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Стандартная процедура связывания.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 30 с до того, как растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 2,5 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и, наконец, NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали DMF (6,25 мл), добавляемым через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В

реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и, наконец, NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смола промывали последовательно три раза следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура связывания со вторичным амином.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 30 с до того, как растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 2,5 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смола промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и, наконец, NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 300 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смола промывали DMF (6,25 мл), добавляемым через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и, наконец, NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 300 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смола промывали последовательно три раза следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура связывания со специальными аминокислотами.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 30 с до того, как растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 2,5 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смола промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. Синтез приостанавливали с помощью программного обеспечения Symphony для добавления в реакционный сосуд в ручном режиме специальной аминокислоты (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), с последующим восстановлением работы в автоматическом режиме: для добавления HATU (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и, наконец, NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 300 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смола промывали последовательно шесть раз следующим образом: DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли Ac_2O /DIPEA/DMF (об./об./об. 1:1:3, 2,5 мл), смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смола промывали последовательно три раза следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Способ В с применением прибора Symphony.

Все манипуляции осуществляли в условиях автоматизации на синтезаторе пептидов Symphony (Protein Technologies). Все процедуры, если не указано иное, осуществляли в полипропиленовой пробирке Symphony, оснащенной фриттой на дне. Пробирка соединяется с синтезатором пептидов Symphony как через дно, так и через верхнюю часть пробирки. Все растворители, DMF, DCM, аминокислоты и реактивы добавляют через дно пробирки, и их пропускают через фритту для контакта со смолой. Все растворы удаляют через дно пробирки. "Периодическое взбалтывание" описывает короткие импульсы подачи газообразного N_2 через фритту на дне; импульс длится примерно 5 с и происходит каждые 15 с. Растворы аминокислот обычно не использовали по прошествии трех недель с момента приготовления. Раствор HATU использовали не позднее 5 суток после приготовления. DMF - диметилформамид; HCTU - 2-(6-хлор-1-Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний; HATU - гексафторфосфат 1-[бис(диметиламино)метил]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридин-3-оксида; NMM - *n*-метилморфолин; DIPEA - диизопропилэтиламин; Зибер - Fmoc-аминоксантен-3-илокси, при этом "3-илокси" описывает положение и тип связи с полистирольной смолой. Применяемая смола представляет собой полимер Меррифилда (полистирол) с линкером Зибера (защищенный Fmoc-группой по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,71 ммоль/г. Также в синтезе можно применять другие обычно применяемые чувствительные к кислотной среде смолы, такие как смола Ринка или функционализированная хлортритильная смола. Обычные применяемые аминокислоты перечислены ниже, причем защитные группы для боковых цепей показаны

внутри круглых скобок.

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 из "Способа В с применением прибора Symphony" описывают эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,050 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зибер, связавшегося со смолой. Масштаб соответствует примерно 70 мг смолы Зибер-Меррифилда, описанной выше. Все процедуры можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,050 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. Перед связыванием аминокислоты все последовательности синтеза соединения начинаются с процедуры обеспечения набухания смолы, описанной ниже в разделе "Процедура набухания". Связывание аминокислот с первичным амином на N-конце используется в разделе "Стандартная процедура связывания", описанном ниже. В связывании аминокислот со вторичным амином на N-конце использовались "Процедура В связывания со вторичным амином", связывание специальных аминокислот обеспечивается посредством ручного присоединения "пустой" аминокислоты в ходе "Процедуры связывания специальных аминокислот", описанной ниже, и хлоруксусный ангидрид добавляют в конечном положении последовательности с использованием "процедуры окончательного экпирования", описанной ниже.

Процедура набухания.

В полипропиленовый реакционный сосуд объемом для твердофазного синтеза с помощью прибора Symphony добавляли смолу Меррифилда:Зибера (70 мг, 0,050 ммоль). Смолу промывали (обеспечивали набухание) три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 10 минут до того, как растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 2,5 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и, наконец, NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали DMF (6,25 мл), добавляемым через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и, наконец, NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 30 с до того, как растворитель сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Стандартная процедура связывания.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 30 с до того, как растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 2,5 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и, наконец, NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали 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 взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли Ac₂O/DIPEA/DMF (об./об./об. 1:1:3, 2,5 мл), смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура связывания со вторичным амином.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 30 с до того, как растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 2,5 мин, а затем раствор сливали через

фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и, наконец, NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 15 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали DMF (6,25 мл), добавляемым через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и, наконец, NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 15 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DIPEA}/\text{DMF}$ (об./об./об. 1:1:3, 2,5 мл), смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура связывания со специальными аминокислотами.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 30 с до того, как растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 2,5 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. Работа системы приостанавливалась системой для добавления в реакционный сосуд ручном режиме в специальной аминокислоты (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) с последующим восстановлением работы в автоматическом режиме для добавления в реакционный сосуд HATU (0,2М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и, наконец, NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали 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 взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DIPEA}/\text{DMF}$ (об./об./об. 1:1:3, 2,5 мл), смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура окончательного кэширования.

Смолу промывали три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), при этом смесь периодически взбалтывали с барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 30 с до того, как растворитель сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 2,5 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.) с последующим добавлением хлоруксусного ангидрида (0,4М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 15 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали DMF (6,25 мл), добавляемым через дно сосуда, и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли NMM (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.) с последующим добавлением хлоруксусного ангидрида (0,4М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически взбалтывали 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 взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DIPEA}/\text{DMF}$ (об./об./об. 1:1:3, 2,5 мл), смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждого промывания DCM (2,5 мл) добавляли через дно сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу затем сушили в парах азота в течение 10 мин.

Способ А полного снятия защитных групп.

Все манипуляции осуществляли в ручном режиме, если не указано иное. Процедура из "Способа А

полного снятия защитных групп" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зибера, связавшегося со смолой. Процедуру можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. "Раствор для снятия защитных групп" готовили с использованием смеси трифторуксусная кислота:вода:триизопропилсилан:дитиотреитол (92,5:2,5:2,5:2,5 об.:об.:об.:вес.). Смолу удаляли из реакционного сосуда и переносили в шприц на 25 мл, оборудованный фриттой. В шприц добавляли "раствор для снятия защитных групп" (5,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 85 мин. Раствор фильтровали, концентрировали и разводили в диэтиловом эфире (30 мл). Осажденное твердое вещество центрифугировали в течение 3 мин. Раствор супернатанта сцеживали и твердое вещество ресуспендировали в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сцеживали и оставшееся твердое вещество суспендировали в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сцеживали и оставшееся твердое вещество сушили в условиях высокого разрежения. Неочищенное соединение получали в виде твердого вещества цветом от белого до грязно-белого.

Способ В полного снятия защитных групп.

Все манипуляции осуществляли в ручном режиме, если не указано иное. Процедура из "Способа В полного снятия защитных групп" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,04 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зибера, связавшегося со смолой. Процедуру можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,04 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. "Раствор для снятия защитных групп" готовили с использованием смеси трифторуксусная кислота:триизопропилсилан (96:4; об.:об.). Смолу удаляли из реакционного сосуда и переносили в шприц на 10 мл, оборудованный фриттой. В шприц добавляли "раствор для снятия защитных групп" (2,0-3,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 1 или 1,5 ч. Раствор фильтровали, промывали раствором для снятия защитных групп (0,5 мл), концентрировали и разводили в диэтиловом эфире (30 мл). Осажденное твердое вещество центрифугировали в течение 3 мин. Раствор супернатанта сцеживали и твердое вещество ресуспендировали в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сцеживали и оставшееся твердое вещество суспендировали в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сцеживали и оставшееся твердое вещество сушили в условиях высокого разрежения. Неочищенное соединение получали в виде твердого вещества цветом от белого до грязно-белого.

Способ С полного снятия защитных групп.

Все манипуляции осуществляли в ручном режиме, если не указано иное. Процедура из "Способа С полного снятия защитных групп" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зибера, связавшегося со смолой. Процедуру можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. "Раствор для снятия защитных групп" готовили с использованием смеси трифторуксусная кислота:триизопропилсилан:дитиотреитол (95:2,5:2,5 об.:об.:вес.). Смолу удаляли из реакционного сосуда и переносили в пробирку Bio-Rad. В пробирку Bio-Rad добавляли "раствор для снятия защитных групп" (4,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 60 минут. Раствор фильтровали и разводили в диэтиловом эфире (30 мл). Осажденное твердое вещество центрифугировали в течение 3 мин. Раствор супернатанта сцеживали и твердое вещество ресуспендировали в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сцеживали и оставшееся твердое вещество суспендировали в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сцеживали и оставшееся твердое вещество сушили в условиях высокого разрежения. Неочищенное соединение получали в виде твердого вещества цветом от белого до грязно-белого.

Способ D полного снятия защитных групп.

Все манипуляции осуществляли в ручном режиме, если не указано иное. Процедура из "Способа В полного снятия защитных групп" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зибера, связавшегося со смолой. Процедуру можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. "Раствор для снятия защитных групп" готовили с использованием смеси трифторуксусная кислота:триизопропилсилан:дитиотреитол (94:3:3 об.:об.:вес.). Смолу удаляли из реакционного сосуда и переносили в шприц на 25 мл, оборудованный фриттой. В шприц добавляли "раствор для снятия защитных групп" (5,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 5 мин. Раствор фильтровали и разводили в диэтиловом эфире (30 мл). Осажденное твердое вещество центрифугировали в течение 3 мин. Раствор супернатанта сцеживали и твердое вещество ресуспендировали в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сцеживали и оставшееся твердое вещество суспендировали в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сцеживали и оставшееся твердое вещество сушили в условиях высокого разрежения. Неочищенное соединение получали в виде твердого вещества цветом от белого до грязно-белого.

Способ Е полного снятия защитных групп.

Все манипуляции осуществляли в ручном режиме, если не указано иное. Процедура из "Способа Е полного снятия защитных групп" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Fmoc Gly-ClTrt, связавшегося со смолой. Процедуру можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. "Раствор для снятия защитных групп" готовили с использованием смеси трифторуксусная кислота:триизопропилсилан:дитиотреитол (95:2,5:2,5 об.:об.:вес.). Смолу удаляли из реакционного сосуда и переносили в пробирку Bio-Rad. В пробирку Bio-Rad добавляли "раствор для снятия защитных групп" (2,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 3 мин. Раствор фильтровали и собирали в центрифужной пробирке. В пробирку Bio-Rad добавляли "раствор для снятия защитных групп" (2,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 3 мин. Раствор фильтровали и собирали в центрифужной пробирке. В пробирку Bio-Rad добавляли "раствор для снятия защитных групп" (2,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 3 мин. Раствор фильтровали и собирали в центрифужной пробирке. Раствору в центрифужной пробирке давали отстояться в течение 60 мин. Собранный раствор затем разводили диэтиловым эфиром (30 мл), и образовывался осадок. Осажденное твердое вещество центрифугировали в течение 3 мин. Раствор супернатанта сцеживали и твердое вещество ресуспендировали в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сцеживали и оставшееся твердое вещество суспендировали в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сцеживали и оставшееся твердое вещество сушили в условиях высокого разрежения. Неочищенное соединение получали в виде твердого вещества цветом от белого до грязно-белого.

Способ F полного снятия защитных групп.

Все манипуляции осуществляли в ручном режиме, если не указано иное. Процедура из "Способа F полного снятия защитных групп" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Ринка, связавшегося со смолой. Процедуру можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. "Раствор для снятия защитных групп" готовили с использованием смеси трифторуксусная кислота:триизопропилсилан:дитиотреитол (95:2,5:2,5 об.:об.:вес.). Смолу удаляли из реакционного сосуда и переносили в пробирку Bio-Rad объемом 6 мл. В пробирку Bio-Rad добавляли "раствор для снятия защитных групп" (4,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 90 мин. Раствор фильтровали и разводили в диэтиловом эфире (30 мл). Осажденное твердое вещество центрифугировали в течение 3 мин. Раствор супернатанта сцеживали и твердое вещество ресуспендировали в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сцеживали и оставшееся твердое вещество суспендировали в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сцеживали и оставшееся твердое вещество сушили в условиях высокого разрежения. Неочищенное соединение получали в виде твердого вещества цветом от белого до грязно-белого.

Способ А циклизации.

Все манипуляции осуществляли в ручном режиме, если не указано иное. Процедура из "Способа А циклизации" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зиберы, связавшегося со смолой, которую использовали для получения соединения. Этот масштаб не основывается на непосредственном определении количества соединения, используемого в процедуре. Процедуру можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. Твердые неочищенные соединения растворяли в растворе ацетонитрила: водном 8М гуанидине/50 мМ TRIS (1:3) (pH 8,6) (7 мл: 18 мл или подобное соотношение) и раствор затем тщательно доводили до pH 8,5-9,0 с использованием водного NaOH (1,0М), если это необходимо. Раствор затем перемешивали с использованием шейкера в течение 12-18 ч. Реакционный раствор концентрировали и остаток затем растворяли в смеси ацетонитрил:вода. Этот раствор подвергали очистке с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением желаемого циклического соединения.

Способ С циклизации.

Все манипуляции осуществляли в ручном режиме, если не указано иное. Процедура из "Способа С циклизации" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зиберы, связавшегося со смолой, которую использовали для получения соединения. Этот масштаб не основывается на непосредственном определении количества соединения, используемого в процедуре. Процедуру можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. Твердые неочищенные соединения растворяли в растворе ацетонитрила: буфера на основе водного 0,1М бикарбоната аммония (11 мл:24 мл или подобное соотношение), и раствор затем тщательно доводили до pH 8,5-9,0 с использованием водного NaOH (1,0М). Раствор затем перемешивали с использованием шейкера в течение 12-18 ч. Реакционный раствор концентрировали и остаток затем растворяли в смеси ацетонитрил:вода. Этот раствор подвергали очистке с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением

желаемого циклического соединения.

Способ D циклизации.

Все манипуляции осуществляли в ручном режиме, если не указано иное. Процедура из "Способа D циклизации" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зибера, связавшегося со смолой, которую использовали для получения соединения. Этот масштаб не основывается на непосредственном определении количества соединения, используемого в процедуре. Процедуру можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. Твердое неочищенное соединение растворяли в растворе ацетонитрила: буфера на основе водного 0,1М бикарбоната аммония (11 мл:24 мл) и раствор затем тщательно доводили до pH 8,5-9,0 с использованием водного NaOH (1,0М). Раствор затем смешивали с перемешиванием в течение 12-18 ч. Реакционный раствор концентрировали и остаток затем растворяли в смеси ацетонитрил:вода. Этот раствор подвергали очистке с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением желаемого циклического соединения.

Способ E циклизации.

Все манипуляции осуществляли в ручном режиме, если не указано иное. Процедура из "Способа E циклизации" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зибера, связавшегося со смолой, которую использовали для получения соединения. Этот масштаб не основывается на непосредственном определении количества соединения, используемого в процедуре. Процедуру можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. Твердое неочищенное соединение растворяли в растворе водного 6М гуанидинового буфера с HCl (15 мл), раствор затем смешивали с перемешиванием в течение 12-18 ч. Реакционный раствор концентрировали и 15 мл DMSO добавляли к остатку с получением взвеси, которую фильтруют. Этот отфильтрованный раствор подвергали очистке с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением желаемого циклического соединения.

Процедура A связывания в ручном режиме.

В реакционный сосуд Bio-Rad, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически встряхивали в течение 5 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно пять раз следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь встряхивали в течение 60 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (1,2-10 эквивалентов), как правило, в количестве (0,2М в DMF, 2,5 мл, 5 экв.), затем HATU (1,210 эквивалентов), как правило, в количестве (0,2М в DMF, 2,5 мл, 5 экв.) и, наконец, DIPEA (2,4-20 эквивалентов), как правило, в количестве (0,8М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь встряхивали в течение периода от 60 мин до 18 ч, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждого промывания DMF (4,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь встряхивали в течение 60 с до того, как раствор сливали через фритту.

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

Все манипуляции осуществляли в ручном режиме, если не указано иное. Процедура из "Способ A N-метилирования на смоле" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Зибера, связавшегося со смолой, которую использовали для получения соединения. Этот масштаб не основывается на непосредственном определении количества соединения, используемого в процедуре. Процедуру можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента.

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

Смолу промывали три раза безводным THF (2,0 мл) для удаления любой оставшейся воды. В высушенный в печи пузырек на 4,0 мл добавляли THF (1,0 мл) и трифенилфосфин (131 мг, 0,500 ммоль) на сухих молекулярных ситах с размером ячейки 4 Å (20 мг). Раствор переносили на смолу и медленно добавляли диизопропилазодикарбоксилат (0,097 мл, 0,5 ммоль). Смолу перемешивали в течение 15 мин. Раствор сливали через фритту и смолу промывали три раза безводным THF (2,0 мл) для удаления любой оставшейся воды. В высушенный в печи пузырек на 4,0 мл добавляли THF (1,0 мл), трифенилфосфин (131 мг, 0,500 ммоль) на сухих молекулярных ситах с размером ячейки 4 Å (20 мг). Раствор переносили

на смолу и медленно добавляли диизопропилазодикарбоксилат (0,097 мл, 0,5 ммоль). Смолу перемешивали в течение 15 мин. Раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали три раза DMF (4,0 мл) и три раза DCM (4,0 мл). Смолу суспендировали в этаноле (1,0 мл) и THF (1,0 мл) и добавляли борогидрид натрия (37,8 мг, 1,000 ммоль). Смесь перемешивали в течение 30 мин и сливали. Смолу последовательно промывали три раза DMF (4,0 мл) и три раза DCM (4,0 мл).

Образование А лактама.

К неочищенному соединению, полученному в результате "Способа D циклизации", добавляют безводный диметилформамид (7,5 мл) с последующим добавлением 1,5 экв. NATU, 3 экв. N-метилморфолина. Реакционный раствор перемешивают в течение периода длительностью от 3 ч до целой ночи при кт. Добавляют ледяную уксусную кислоту (3 капли) и растворитель удаляют посредством выпаривания в Genevac EZ2. Соединение солибилизируют в DMF (2 мл), фильтруют через шприцевой фильтр с размером ячеек 0,2 мкм и направляют на обращенно-фазовую очистку.

Образование В лактама.

К соединению, полученному в результате очистки, добавляют безводный диметилформамид (1 мл) с последующим добавлением 1,5 экв. NATU в виде свежеприготовленного маточного раствора в DMF (0,1M) и 3 экв. N-метилморфолина в виде свежеприготовленного 0,3M маточного раствора в DMF. Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при кт, фильтруют через фильтр с размером ячеек 0,2 мкм и направляют на обращенно-фазовую очистку.

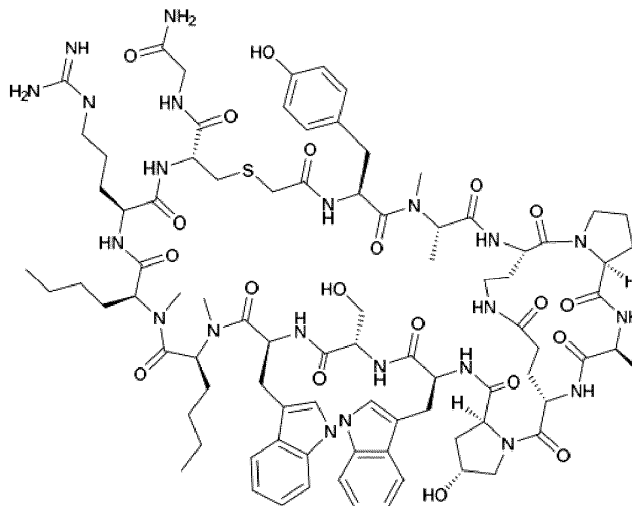
Микрорасщепление А.

К небольшому <10 мг образцу смолы добавляют 2 капли TIS и 1 мл трифторуксусной кислоты, встряхивают при кт. Спустя 1 ч удаляют небольшую аликвоту и разводят 0,5 мл ацетонитрила, фильтруют и осуществляют анализ методом LC-MS.

Общая последовательность синтеза.

"Общая последовательность синтеза" описывает общую последовательность процедур, которую применяют для получения циклических соединений, описанных в данном документе. Последовательность состоит из общих способов, описанных выше. Последовательность начиналась с процедуры набухания смолы. Затем серию процедур связывания аминокислот последовательно осуществляли с использованием процедуры связывания с одной группой, если N-конец связанного со смолой соединения представлял собой первичный амин, или процедуры связывания с двумя группами, если N-конец связанного со смолой соединения представлял собой вторичный амин. После связывания всех аминокислот в последовательности дополнительные процедуры осуществляли в заданном порядке: окончательное промывание, связывание с хлоруксусной кислотой, полное снятие защитных групп, циклизация и, наконец, образование лактама.

Получение примера 1400



Молекулярная масса: 1828,13

Пример 1400 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ С полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации" и "Образование А лактама".

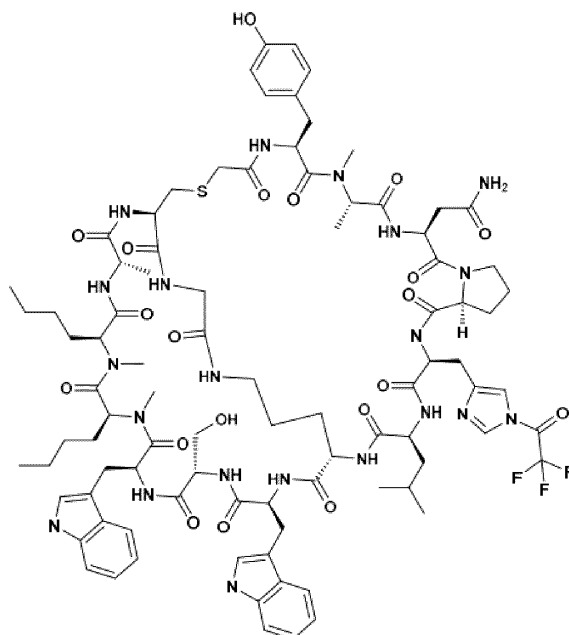
Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: Waters XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 10-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20

мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 0,5 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 99%.

Условия D LCMS анализа: время удержания = 1,44 мин; ESI-MS(+) m/z 914,7 (M+2H).

Условия E LCMS анализа: время удержания = 1,46 мин; ESI-MS(+) m/z 914,6 (M+2H).

Получение примера 1401



Молекулярная масса: 1905,13

Пример 1401 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ С полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации".

Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: Waters XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 10-60% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 15-60% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 3,7 мг.

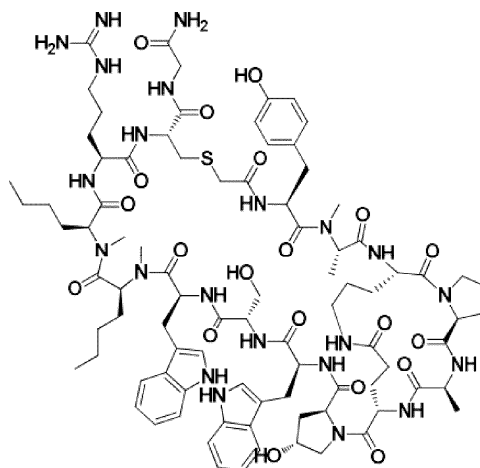
За этим следовало "образование В лактама".

Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: Waters XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 15-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 1,2 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 91%.

Условия D LCMS анализа: время удержания = 1,54 мин; ESI-MS(+) m/z 954,3 (M+2H).

Условия E LCMS анализа: время удержания = 1,52 мин; ESI-MS(+) m/z 954,1 (M+2H).

Получение примера 1402



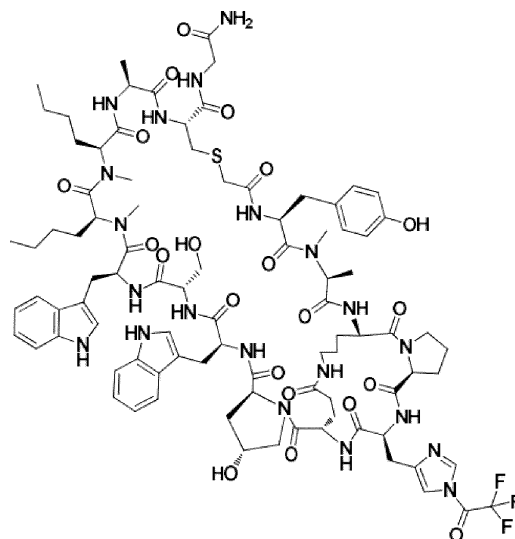
Молекулярная масса: 1842,13

Пример 1402 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ С полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации" и "Образование А лактама". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: Колонка: Waters XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 10-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 4,6 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 99%.

Условия D LCMS анализа: время удержания = 1,44 мин; ESI-MS(+) m/z 921,7 (M+2H).

Условия E LCMS анализа: время удержания = 1,46 мин; ESI-MS(+) m/z 921,7 (M+2H).

Получение примера 1403



Молекулярная масса: 1919,09

Пример 1403 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ С полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: Колонка: Waters XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 10-

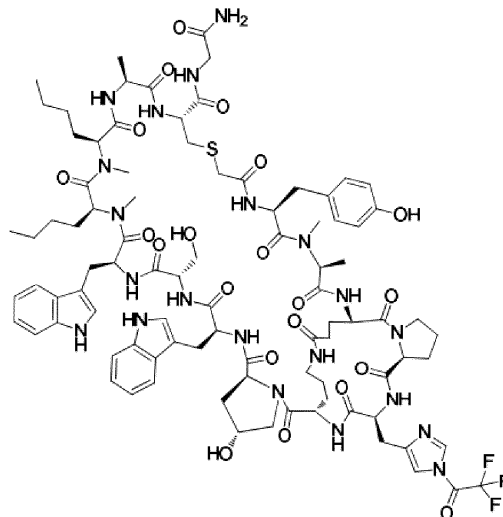
61% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 19,2 мг.

За этим следовало "образование В лактама". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: Waters XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 10-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 3,5 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 91%.

Условия D LCMS анализа: время удержания = 1,39 мин; ESI-MS(+) m/z 961,3 (M+2H).

Условия E LCMS анализа: время удержания = 1,41 мин; ESI-MS(+) m/z 961,2 (M+2H).

Получение примера 1404



Молекулярная масса: 1919,09

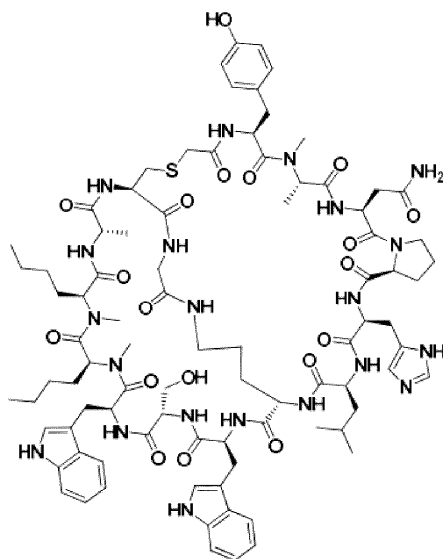
Пример 1404 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ С полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: Waters XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 10-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 15-60% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 12,8 мг.

За этим следовало "образование В лактама". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: Waters XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 10-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 1,1 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 92%.

Условия D LCMS анализа: время удержания = 1,49 мин; ESI-MS(+) m/z 961,2 (M+2H).

Условия E LCMS анализа: время удержания = 1,51 мин; ESI-MS(+) m/z 961,3 (M+2H).

Получение примера 1405



Молекулярная масса: 1809,10

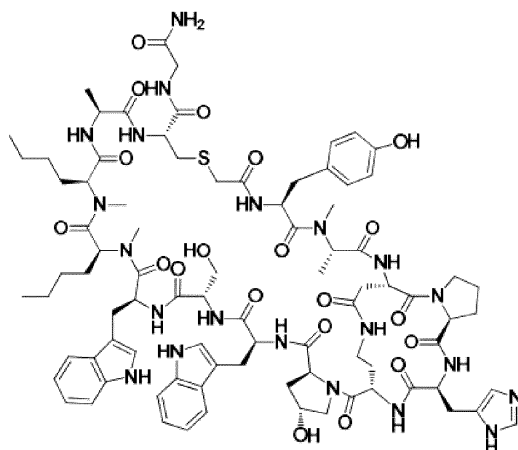
Пример 1405 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ С полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации" и "Образование А лактама".

Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 15-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центростремительного испарителя. Выход продукта составлял 2,4 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 94%.

Условия D LCMS анализа: время удержания = 1,55 мин; ESI-MS(+) m/z 905,4 (M+2H).

Условия E LCMS анализа: время удержания = 1,55 мин; ESI-MS(+) m/z 905,6 (M+2H).

Получение примера 1500



Молекулярная масса: 1795,03

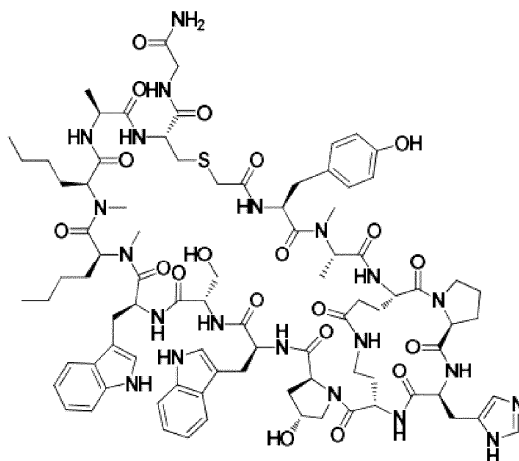
Пример 1500 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ С полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации" и "Образование А лактама". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: Колонка: Waters XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацето-

нитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 10-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 20-60% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 1,3 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 99%.

Условия D LCMS анализа: время удержания = 1,50 мин; ESI-MS(+) m/z 898,5 (M+2H).

Условия E LCMS анализа: время удержания = 1,44 мин; ESI-MS(+) m/z 898,2 (M+2H).

Получение примера 1501



Молекулярная масса: 1809,05

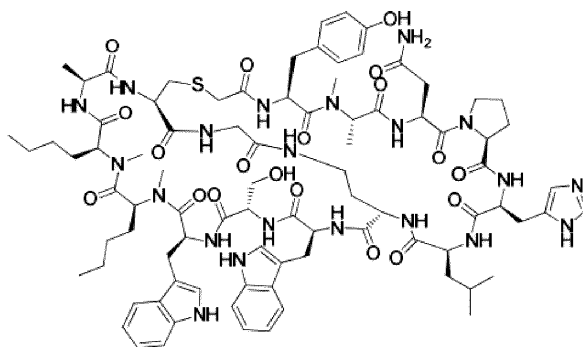
Пример 1501 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ С полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации" и "Образование А лактама". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: Waters XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 10-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 15-60% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 4,8 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 99%.

Условия D LCMS анализа: время удержания = 1,45 мин; ESI-MS(+) m/z 905,3 (M+2H).

Условия E LCMS анализа: время удержания = 1,41 мин; ESI-MS(+) m/z 905,4 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: расчетное значение: 904,9325 (M+2H); выявленное значение: 904,9305 (M+2H)

Получение примера 1502



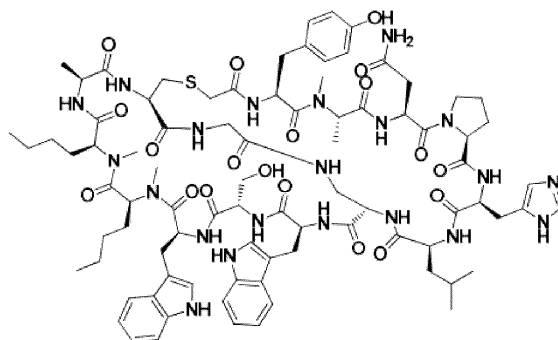
Молекулярная масса: 1795,07

Пример 1502 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ Е полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации" и "Образование А лактама". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: Waters XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 10-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 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: 20-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; градиент: 20-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 9,8 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 97%.

Условия D LCMS анализа: время удержания = 1,60 мин; ESI-MS(+) m/z 898,5 (M+2H).

Условия E LCMS анализа: время удержания = 1,56 мин; ESI-MS(+) m/z 898,4 (M+2H).

Получение примера 1503



Молекулярная масса: 1781,04

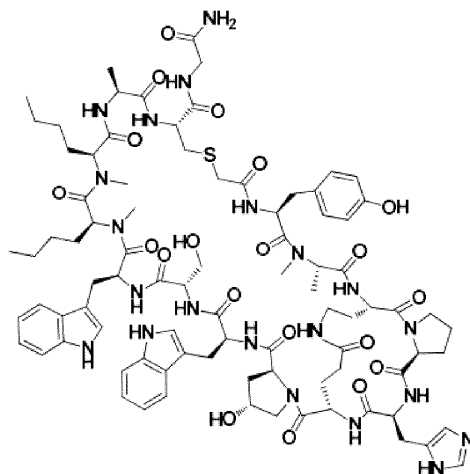
Пример 1503 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ Е полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации" и "Образование А лактама". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: Waters XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% триф-

торуксусной кислоты; градиент: 15-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 25-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 3,7 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 96%.

Условия D LCMS анализа: время удержания = 1,63 мин; ESI-MS(+) m/z 891,7 (M+2H).

Условия E LCMS анализа: время удержания = 1,60 мин; ESI-MS(+) m/z 891,2 (M+2H).

Получение примера 1504



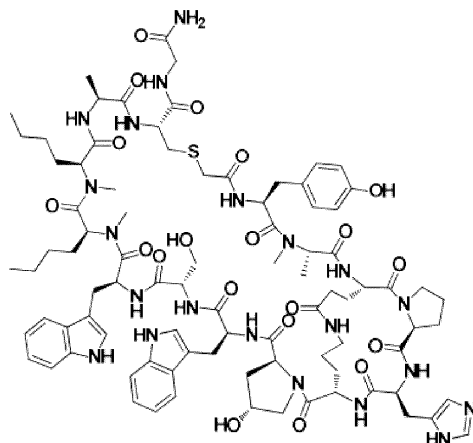
Молекулярная масса: 1809,05

Пример 1504 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ F полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации" и "Образование А лактама". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: Waters XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 10-60% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 10-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 2,4 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия D LCMS анализа: время удержания = 1,43 мин; ESI-MS(+) m/z 905,4 (M+2H).

Условия E LCMS анализа: время удержания = 1,40 мин; ESI-MS(+) m/z 905,3 (M+2H).

Получение примера 1505



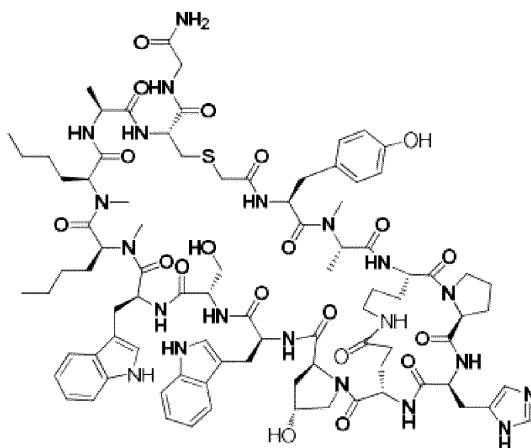
Молекулярная масса: 1823,08

Пример 1505 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ F полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации" и "Образование А лактама". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: Waters XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 10-65% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 250 мм, частицы с диаметром 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: 15-60% В за 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 3,7 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия D LCMS анализа: время удержания = 1,50 мин; ESI-MS(+) m/z 912,2 (M+2H).

Условия E LCMS анализа: время удержания = 1,42 мин; ESI-MS(+) m/z 912,4 (M+2H).

Получение примера 1506



Молекулярная масса: 1823,08

Пример 1506 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ Е полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации" и "Образование А лактама". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол: вода с

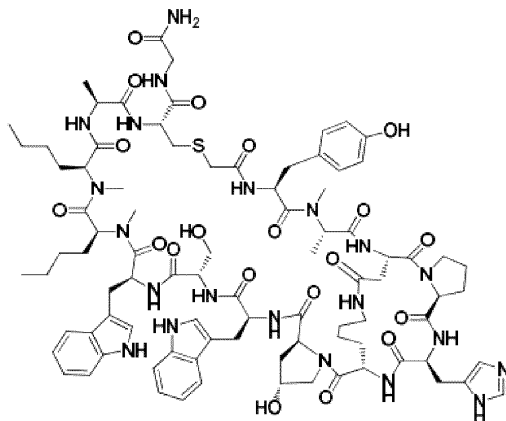
10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 40-80% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 1,2 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 96%.

Условия Н LCMS анализа: время удержания = 1,49 мин; ESI-MS(+) m/z 912,6 (M+2H).

Условия I LCMS анализа: время удержания = 2,60 мин; ESI-MS(+) m/z 912,7 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z : расчетное значение: 911,9403 (M+2H); выявленное значение: 911,9391 (M+2H).

Получение примера 1507



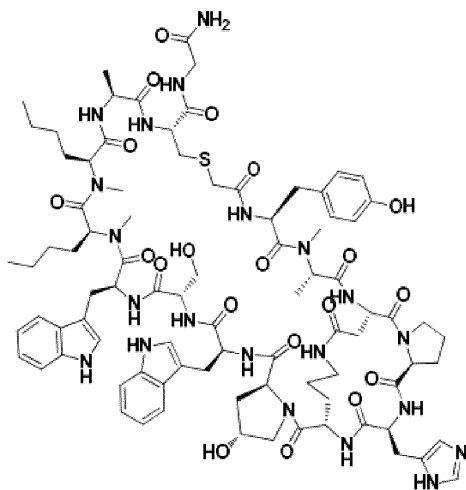
Пример 1507 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ Е полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации" и "Образование А лактама". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 40-80% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 15-55% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 4,5 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 98%.

Условия Н LCMS анализа: время удержания = 1,54 мин; ESI-MS(+) m/z 913,2 (M+2H).

Условия I LCMS анализа: время удержания = 2,67 мин; ESI-MS(+) m/z 912,9 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z : расчетное значение: 911,9385 (M+2H); выявленное значение: 911,9403 (M+2H).

Получение примера 1508



Молекулярная масса: 1809,05

Пример 1508 получали, следуя "Общей последовательности синтеза", описанной выше, состоящей из следующих общих процедур: "Способ С с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура связывания со вторичным амином", "Способ С с применением прибора Prelude: процедура окончательного промывания", "Процедура В связывания с хлоруксусной кислотой", "Способ Е полного снятия защитных групп", "Способ D циклизации" и "Образование А лактама". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислоты; градиент: 15-55% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол: вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол: вода с 10 мМ ацетатом аммония; градиент: 40-80% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 6,7 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия H LCMS анализа: время удержания = 1,55 мин; ESI-MS(-) m/z 904,7 (M+2H).

Условия I LCMS анализа: время удержания = 3,11 мин; ESI-MS(+) m/z 905,1 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: расчетное значение: 904,9302 (M+2H); выявленное значение: 904,9325 (M+2H).

Следующие процедуры использовали для примеров 5001-5008.

Данные анализа.

Масс-спектрометрия: "ESI-MS(+)" обозначает масс-спектрометрию с ионизацией в режиме электрораспыления, осуществляемую в режиме выявления положительно заряженных ионов; "ESI-MS(-)" обозначает масс-спектрометрию с ионизацией в режиме электрораспыления, осуществляемую в режиме выявления отрицательно заряженных ионов; "ESI-HRMS(+)" обозначает масс-спектрометрию с высокой разрешающей способностью и с ионизацией в режиме электрораспыления, осуществляемую в режиме выявления положительно заряженных ионов; "ESI-HRMS(-)" обозначает масс-спектрометрию с высокой разрешающей способностью и с ионизацией в режиме электрораспыления, осуществляемую в режиме выявления отрицательно заряженных ионов. Выявленные массы приводят, следуя обозначению единиц "m/z". Соединения с точными массами более чем 1000 часто выявляют в виде двухзарядными или трехзарядными ионами.

Условия А анализа.

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

Условия В анализа.

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

Условия С анализа.

Колонка: Phenomenex Luna C18 2,0 × 30 мм, частицы с диаметром 3,0 мкм; подвижная фаза А: ацетонитрил:вода (10:90) с 0,1% TFA; подвижная фаза В: ацетонитрил:вода (90:10) с 0,1% TFA; температура: 40°C; градиент: 0% В, 0-100% В за 2 мин, затем выдерживание в течение 1,0 мин в 100% В; поток: 0,8 мл/мин; выявление: в УФ при длине волны 220 нм.

Условия D анализа.

Колонка: Waters Aquity BEH C18 2,1 × 50 мм, частицы с диаметром 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 за 1,5 мин, затем выдерживание в течение 0,5 мин в 100% В; поток: 0,8 мл/мин; выявление: в УФ при длине волны 220 нм.

Условия анализа Е.

Колонка: Waters Aquity BEH C18 2,1 × 50 мм, частицы с диаметром 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 за 3 мин, затем выдерживание в течение 0,5 мин в 100% В; поток: 0,8 мл/мин; выявление: в УФ при длине волны 220 нм.

Общие процедуры.

Способ А с применением прибора Prelude.

Все манипуляции осуществляли в условиях автоматизации на синтезаторе пептидов Prelude (Protein Technologies). Все процедуры, если не указано иное, осуществляли в полипропиленовой пробирке на 10

мл, оснащенной фриттой на дне; при этом масштаб реакции превышал 0,100 ммоль, использовали полипропиленовую пробирку на 40 мл, оснащенную фриттой на дне. Пробирка соединяется с синтезатором пептидов Prelude как через дно, так и через верхнюю часть пробирки. DMF и DCM можно добавлять через верхнюю часть пробирки, что обеспечивает одинаковое промывание боковых поверхностей пробирки. Остальные реактивы добавляют через дно пробирки, и их пропускают через фритту для контакта со смолой. Все растворы удаляют через дно пробирки. "Периодическое взбалтывание" описывает короткие импульсы подачи газообразного N_2 через фритту на дне; импульс длится примерно 5 с и происходит каждые 30 с. Растворы хлорацетилхлорида в DMF использовали не позднее 24 ч после приготовления. Растворы аминокислот обычно не использовали по прошествии трех недель с момента приготовления. Растворы HATU использовали не позднее 5 суток после приготовления. DMF - диметилформамид; HATU - гексафторфосфат 1-[бис(диметиламино)метиле]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиний-3-оксида; DIPEA - диизопропилэтиламин; Ринк - (2,4-диметоксифенил)(4-алкоксифенил)метанамин, при этом "4-алкокси" описывает положение и тип связи с полистирольной смолой. Применяемая смола представляет собой полимер Меррифила (полистирол) с линкером Ринка (защищенный Fmoc-группой по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,56 ммоль/г. Обычные применяемые аминокислоты перечислены ниже, причем защитные группы для боковых цепей показаны внутри круглых скобок. 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 из "Способа А с применением прибора Prelude" описывают эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Ринка, связавшегося со смолой. Масштаб соответствует примерно 178 мг смолы Ринка-Меррифила, описанной выше. Все процедуры можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. Перед связыванием аминокислоты все последовательности синтеза соединения начинаются с процедуры обеспечения набухания смолы, описанной ниже в разделе "Процедура набухания смолы". Связывание аминокислот с первичным амином на N-конце используется в разделе "Процедура связывания с одной группой", описанном ниже. Связывание аминокислот с вторичным амином на N-конце используется в разделе "Процедура связывания с двумя группами", описанном ниже. Связывание хлорацетилхлорида с N-концом соединения описано в разделе "Процедура связывания с хлорацетилхлоридом", подробно описанном ниже.

Процедура набухания смолы.

В полипропиленовый реакционный сосуд объемом 10 мл для твердофазного синтеза добавляли смолу Меррифила:Ринка (178 мг, 0,100 ммоль). Смолу промывали (обеспечивали набухание) три раза следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,0 мл), при этом смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин до того, как растворитель сливали через фритту.

Процедура связывания с одной группой.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 1,0 мл, 2 экв.), затем HATU (0,2М в DMF, 1,0 мл, 2 экв.) и, наконец, DIPEA (0,8М в DMF, 0,5 мл, 4 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 15 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждого промывания DMF (2,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли уксусный ангидрид (2,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждого промывания DMF (2,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура связывания с двумя группами.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до

того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 1,0 мл, 2 экв.), затем HATU (0,2М в DMF, 1,0 мл, 2 экв.) и, наконец, DIPEA (0,8М в DMF, 0,5 мл, 4 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 15 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали два раза следующим образом: для каждого промывания DMF (2,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2М в DMF, 1,0 мл, 2 экв.), затем HATU (0,2М в DMF, 1,0 мл, 2 экв.) и, наконец, DIPEA (0,8М в DMF, 0,5 мл, 4 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 15 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали два раза следующим образом: для каждого промывания DMF (2,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли уксусный ангидрид (2,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 10 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждого промывания DMF (2,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу использовали прямо на следующей стадии.

Процедура связывания с хлорацетилхлоридом.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предшествующей стадии, добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли смесь пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически взбалтывали в течение 3 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно шесть раз следующим образом: для каждого промывания DMF (2,0 мл) добавляли через верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 30 с до того, как раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли DIPEA (0,8М в DMF, 3,0 мл, 24 экв.) с последующим добавлением хлорацетилхлорида (0,8М в DMF, 1,65 мл, 13,2 экв.). Смесь периодически взбалтывали в течение 30 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: для каждого промывания DMF (2,0 мл) добавляли в верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: CH_2Cl_2 (2,0 мл) добавляли в верхнюю часть сосуда и полученную в результате смесь периодически взбалтывали в течение 90 с до того, как раствор сливали через фритту. Полученную в результате смолу помещали в пары N_2 на 15 мин.

Способ А с применением прибора Symphony.

Этот набор процедур является идентичным "Способу А с применением прибора Prelude", за исключением указанного. Для всех процедур использовали синтезатор пептидов Symphony X (Protein Technologies) вместо синтезатора пептидов Prelude, и все реактивы добавляли через верхнюю часть реакционного сосуда.

Процедура набухания смолы.

Эта процедура является идентичной "Способ А с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы".

Процедура связывания с одной группой.

Эта процедура является идентичной "Способ А с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", за исключением того, что концентрация раствора DIPEA составляла 0,4М, и 1,0 мл этого раствора доставляли в реакционную смесь.

Процедура связывания с двумя группами.

Эта процедура является идентичной "Способ А с применением прибора Prelude: процедура связывания с двумя группами", за исключением того, что концентрация раствора DIPEA составляла 0,4М, и 1,0 мл этого раствора доставляли в реакционную смесь.

Процедура связывания с хлорацетилхлоридом.

Эта процедура является идентичной "Способ А с применением прибора Prelude: процедура связывания с хлорацетилхлоридом".

Способ А полного снятия защитных групп.

Все манипуляции осуществляли в ручном режиме, если не указано иное. Процедура из "Способа А полного снятия защитных групп" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Ринка, связавшегося со смолой. Процедуру можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. "Раствор для снятия защитных групп" готовили посредством объединения в стеклянном пузырьке на 40 мл трифторуксусной кислоты (22 мл), фенола (1,325 г), воды (1,25 мл) и триизопропилсилан (0,5 мл). Смолу удаляли из реакционного сосуда и переносили в стеклянный пузырек объемом 4 мл. В пузырек добавляли "раствор для снятия защитных групп" (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 шприцевый фильтр с размером ячеек 0,2 мкм и твердые веще-

ства экстрагировали с использованием "раствора для снятия защитных групп" (1,0 мл) или TFA (1,0 мл). В тестовую пробирку на 24 мл, заполненную объединенными филтратами, добавляли Et₂O (15 мл). Смесь интенсивно перемешивали, при этом осаждалось значительное количество белого твердого вещества. Смесь центрифугировали в течение 5 мин, затем раствор сцеживали из твердых веществ и сливали. Твердые вещества суспендировали в Et₂O (20 мл); затем смесь центрифугировали в течение 5 минут; и раствор сцеживали из твердых веществ и сливали. В последний раз твердые вещества суспендировали в Et₂O (20 мл); смесь центрифугировали в течение 5 мин; и раствор сцеживали из твердых веществ и сливали для получения неочищенного соединения в виде твердого вещества цветом от белого до грязно-белого.

Способ А циклизации.

Все манипуляции осуществляли в ручном режиме, если не указано иное. Процедура из "Способа А циклизации" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Ринка, связавшегося со смолой, которую использовали для получения соединения. Этот масштаб не основывается на непосредственном определении количества соединения, используемого в процедуре. Процедуру можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. Твердые неочищенные соединения растворяли в MeCN:водн. 0,1M NH₄OAc (1:1) до общего объема 60 мл, а затем раствор тщательно доводили до pH 8,5-9,0 с использованием водного NaOH (1,0M). Раствор затем перемешивали в течение 12-18 ч. Реакционный раствор концентрировали и остаток затем растворяли в смеси DMSO:MeOH. Этот раствор подвергали очистке с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением желаемого циклического соединения.

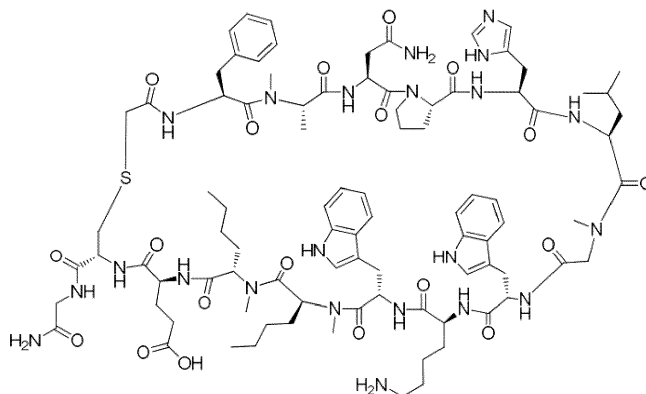
Способ В циклизации.

Все манипуляции осуществляли в ручном режиме, если не указано иное. Процедура из "Способа А циклизации" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 0,100 ммоль, при этом масштаб определяется количеством линкера Ринка, связавшегося со смолой, которую использовали для получения соединения. Этот масштаб не основывается на непосредственном определении количества соединения, используемого в процедуре. Процедуру можно масштабировать до количеств, превышающих масштаб 0,100 ммоль, посредством коррекции описанных объемов с использованием масштабного коэффициента. Твердые неочищенные соединения растворяли в MeCN:водн. 0,1M NH₄OAc (1:1) до общего объема 18-22 мл, а раствор затем тщательно доводили до pH 8,5-9,0 с использованием водного NaOH (1,0M). Раствору затем давали отстояться без перемешивания в течение 12-18 ч. Реакционный раствор концентрировали и остаток затем растворяли в смеси DMSO:MeOH. Этот раствор подвергали очистке с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением желаемого циклического соединения.

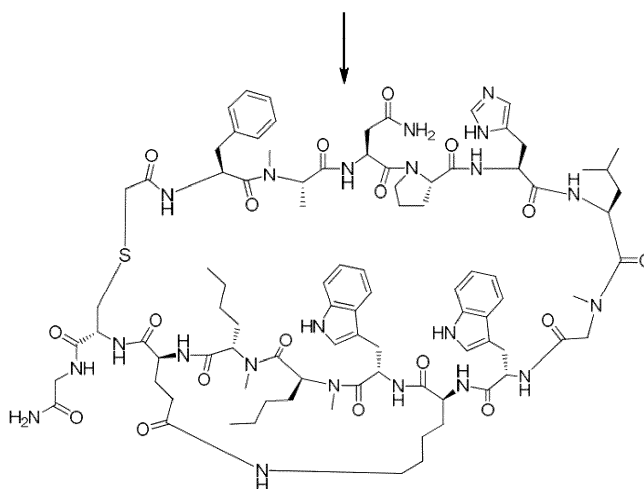
Общая последовательность синтеза А.

"Общая последовательность синтеза А" описывает общую последовательность процедур, которую применяют для получения циклических соединений, описанных в данном документе. В контексте этой общей процедуры процедуры "Способа А с применением прибора Symphony" являются взаимозаменяемо с процедурами "Способа А с применением прибора Prelude". В полипропиленовый реакционный сосуд объемом 10 мл для твердофазного синтеза добавляли смолу Ринка-Меррифилда (178 мг, 0,100 ммоль) и реакционный сосуд помещали в синтезатор пептидов Prelude. "Способ А с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы" был следующим. Затем серию из процедур связывания аминокислот осуществляли последовательно на приборе Prelude, следуя "Способу А с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", если N-конец связанного со смолой соединения представлял собой первичный амин, или "Способу А с применением прибора Prelude: процедура связывания с двумя группами", если N-конец связанного со смолой соединения представлял собой вторичный амин. "Способ А с применением прибора Prelude: процедура связывания с хлорацетилхлоридом" был следующим; затем "Способ А полного снятия защитных групп" был следующим; затем "Способ А циклизации" был следующим.

Получение примера 5001



Промежуточное соединение 5001



Пример 5001

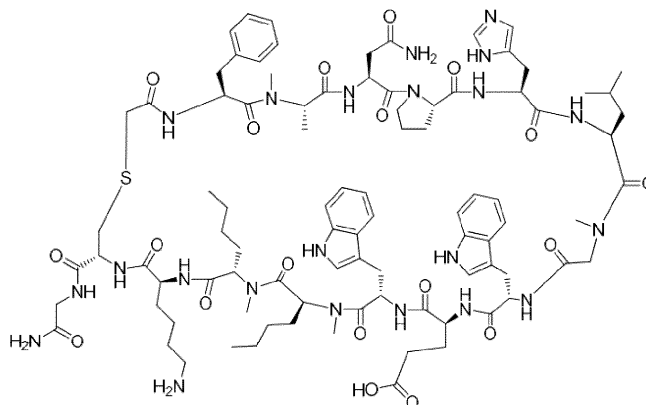
Промежуточное соединение 5001 получали, следуя разделу "Общая последовательность синтеза А", в масштабе 0,200 ммоль. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной ВЭЖХ со следующими условиями: колонка: Luna C18, 30 × 100 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% TFA; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% TFA; градиент: 0-60% В за 10 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 42 мл/мин. Желаемый продукт элюировался в момент времени 9,32 мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 53,8 мг. Условия анализа D: время удержания = 1,106 мин; ESI-MS(+) m/z 934,05 (M+2H).

Пример 5001 получали следующим образом. В пузырек объемом 2 мл, заполненный промежуточным соединением 5001 (53,8 мг, 0,029 ммоль) в DMF (3 мл), добавляли DIPEA (0,101 мл, 0,577 ммоль) и HATU (43,8 мг, 0,115 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 50-90% В за 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 11,2 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 99%.

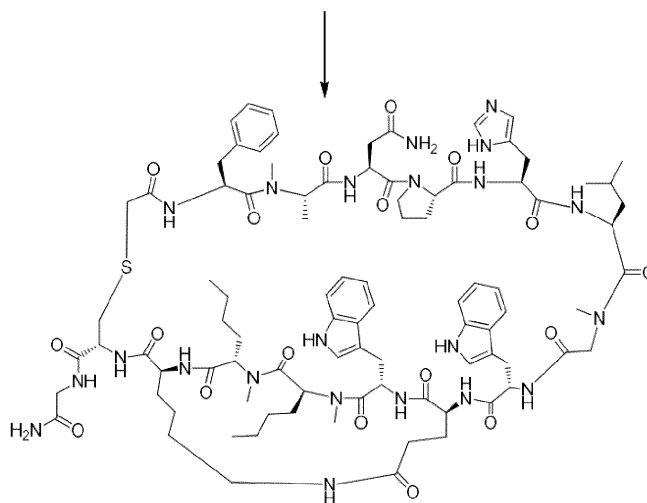
Условия анализа А: время удержания = 1,96 мин; ESI-MS(+) m/z 924,6 (M+2H).

Условия анализа В: время удержания = 3,13 мин; ESI-MS(+) m/z 924,7 (M+2H).

Получение примера 5002



Промежуточное соединение 5002



Пример 5002

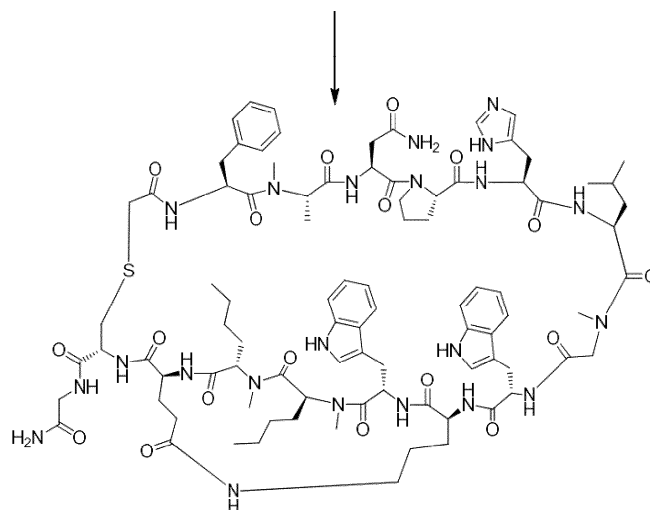
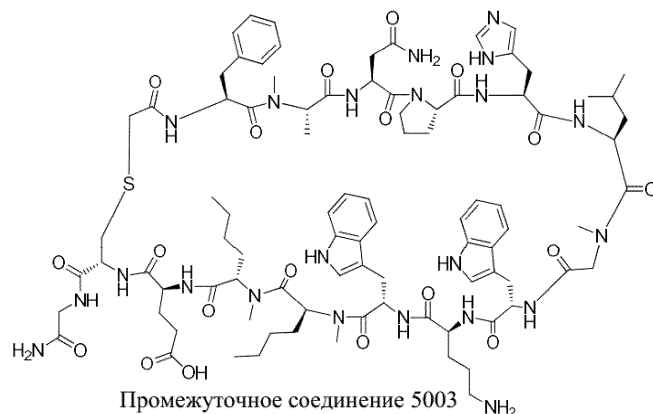
Промежуточное соединение 5002 получали, следуя разделу "Общая последовательность синтеза А", в масштабе 0,200 ммоль. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной ВЭЖХ со следующими условиями: колонка: Luna C18, 30 × 100 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% TFA; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% TFA; градиент: 10-60% В за 10 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 42 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 50,0 мг. Условия анализа С: время удержания = 1,272 мин; ESI-MS(+) m/z 933,75 (M+2H).

Пример 5002 получали следующим образом. В пузырек объемом 7 мл, заполненный промежуточным соединением 5002 (50 мг, 0,024 ммоль) в DMF (3 мл), добавляли DIPEA (0,083 мл, 0,478 ммоль) и HATU (36,3 мг, 0,096 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 30-70% В за 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 14,6 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия анализа А: время удержания = 1,82 мин; ESI-MS(+) m/z 924,8 (M+2H).

Условия анализа В: время удержания = 3,01 мин; ESI-MS(+) m/z 923,3 (M-2H).

Получение примера 5003



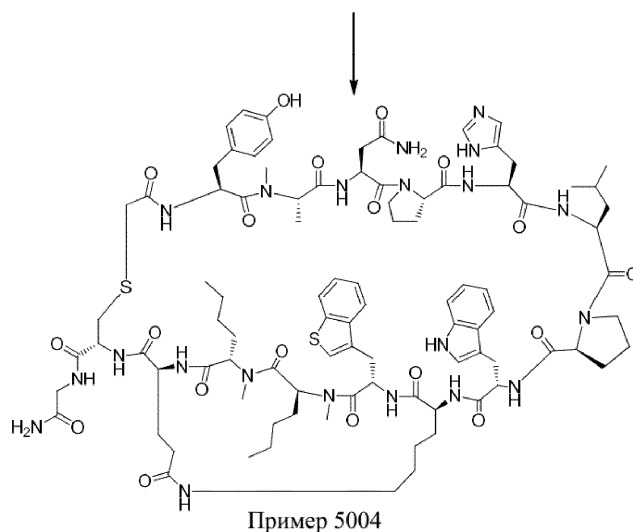
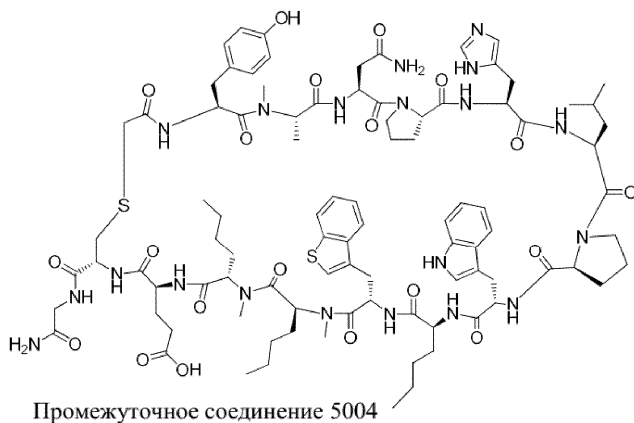
Промежуточное соединение 5003 получали, следуя разделу "Общая последовательность синтеза А", в масштабе 0,200 ммоль. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной ВЭЖХ со следующими условиями: колонка: Luna C18, 30 × 100 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% TFA; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% TFA; градиент: 10-60% В за 10 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 42 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 50,0 мг. Условия анализа С: время удержания = 1,300 мин; ESI-MS(+) m/z 926,75 (M+2H).

Пример 5003 получали следующим образом. В пузырек объемом 7 мл, заполненный промежуточным соединением 5003 (50 мг, 0,024 ммоль) в DMF (3 мл), добавляли DIPEA (0,084 мл, 0,481 ммоль) и NATU (36,6 мг, 0,096 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 25-65% В за 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 50-90% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 12,5 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 98%.

Условия анализа А: время удержания = 1,94 мин; ESI-MS(+) m/z 917,5 (M+2H).

Условия анализа В: время удержания = 3,03 мин; ESI-MS(+) m/z 917,4 (M+2H)

Получение примера 5004



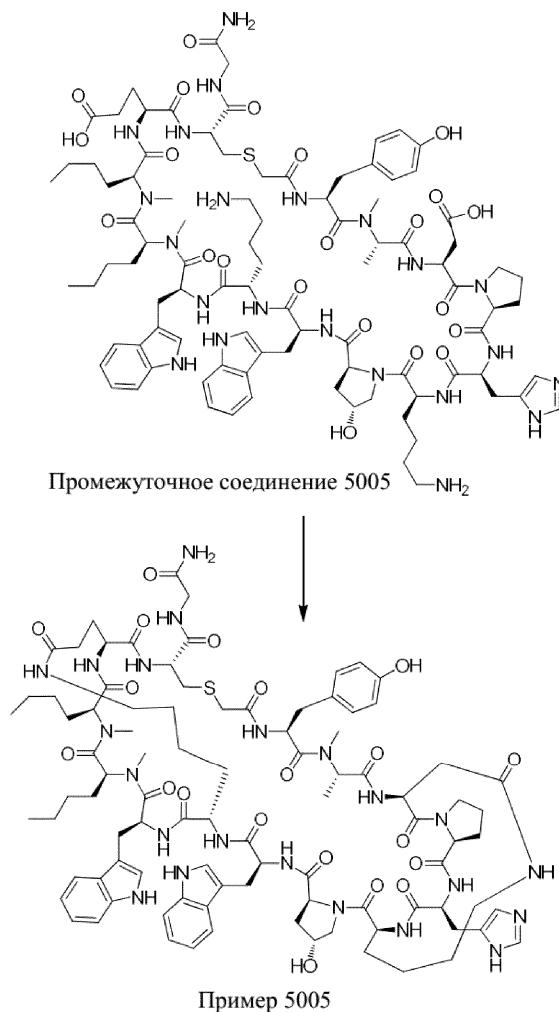
Промежуточное соединение 5004 получали, следуя разделу "Общая последовательность синтеза A", в масштабе 0,200 ммоль. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной ВЭЖХ со следующими условиями: колонка: Luna C18, 30 × 100 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% TFA; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% TFA; градиент: 10-60% B за 10 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% B; поток: 42 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 35,5 мг. Условия анализа D: время удержания = 1,557 мин; ESI-MS(+) m/z 963,6 (M+2H).

Пример 5004 получали следующим образом. Промежуточное соединение 5004 (35,5 мг, 0,018 ммоль) растворяли в DMF (2,0 мл). К раствору добавляли DIPEA (0,075 мл, 0,43 ммоль), затем HATU (28 мг, 0,074 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 35-75% B за 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% B; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 4,9 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 95%.

Условия анализа A: время удержания = 2,14 мин; ESI-MS(+) m/z 954,1 (M+2H).

Условия анализа B: время удержания = 2,93 мин; ESI-MS(+) m/z 952,4 (M-2H).

Получение примера 5005



Промежуточное соединение 5005 получали, следуя разделу "Общая последовательность синтеза А", в масштабе 0,600 ммоль с использованием "Способа В циклизации" вместо "Способа А циклизации". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 15-55% В за 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 45-85% В за 40 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Полученный в результате материал перетирали в порошок с водной HCl, затем сушили в вакууме. Выход продукта составлял 112,8 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 93%.

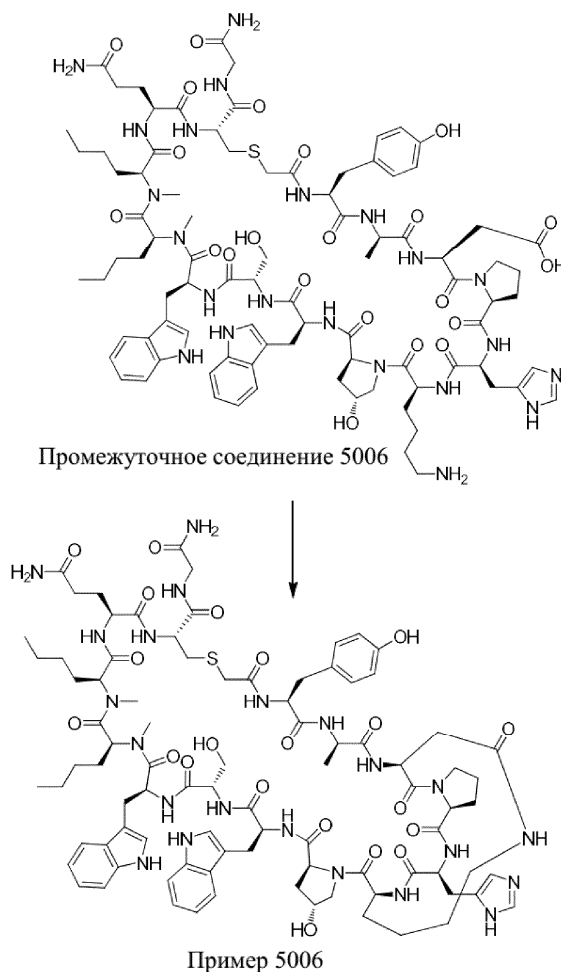
Условия анализа А: время удержания = 1,37 мин; ESI-MS(+) m/z 971,2 (M+2H).

Условия анализа В: время удержания = 2,58 мин; ESI-MS(+) m/z 971,3 (M+2H).

Пример 5005 получали следующим образом. В пузырек объемом 15 мл, оснащенный якорем для магнитной мешалки и загруженный промежуточным соединением 5005 (26,0 мг, 0,013 ммоль), добавляли DMF (0,50 мл), затем DIPEA (0,023 мл, 0,129 ммоль), затем HATU (12,28 мг, 0,032 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин. В реакционный сосуд добавляли этаноламин (0,1 мл). Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 45-85% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 7 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 8,0 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия анализа А: время удержания = 1,58 мин; ESI-MS(+) m/z 952,8 (M+2H).

Условия анализа В: время удержания = 2,73 мин; ESI-MS(+) m/z 953,2 (M+2H).
Получение примера 5006



Промежуточное соединение 5006 получали, следуя разделу "Общая последовательность синтеза А", в масштабе 0,400 ммоль с использованием "Способа В циклизации" вместо "Способа А циклизации". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 10-50% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 40-80% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 54,7 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия анализа А: время удержания = 1,43 мин; ESI-MS(+) m/z 941,3 (M-2H).

Условия анализа В: время удержания = 2,62 мин; ESI-MS(+) m/z 940,8 (M-2H).

ESI-HRMS(+) m/z : расчетное значение: 942,4485 выявленное значение: 942,4475.

Пример 5006 получали следующим образом. В 1 мензурку, оснащенную якорем для магнитной мешалки и загруженную промежуточным соединением 5006 (40 мг, 0,020 ммоль), добавляли NMP (1,00 мл), затем DIPEA (0,036 мл, 0,20 ммоль), затем HATU (19 мг, 0,051 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. В реакционный раствор добавляли MeNH₃Cl (5 мг) и HATU (10 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. К раствору добавляли AcOH (3 капли). Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 45-100% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10

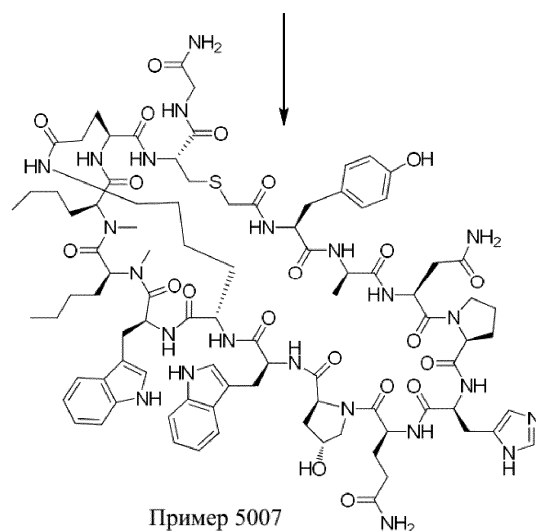
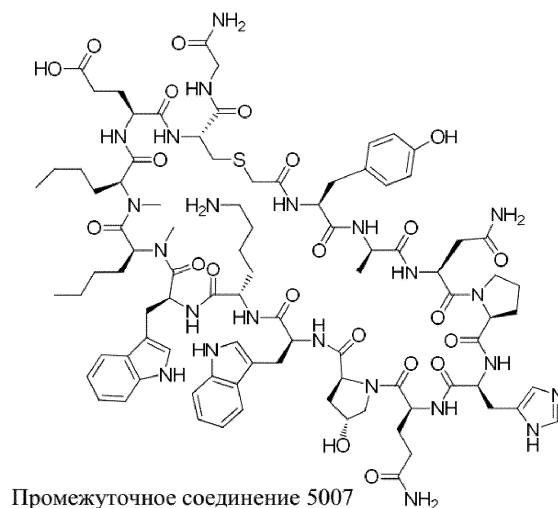
мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; градиент: 10-50% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 5,2 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия анализа А: время удержания = 1,497 мин; ESI-MS(+) m/z 933,45 (M+2H).

Условия анализа В: время удержания = 2,139 мин; ESI-MS(+) m/z 933,70 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: расчетное значение: 933,4432 выявленное значение: 933,4416.

Получение примера 5007



Промежуточное соединение 5007 получали, следуя разделу "Общая последовательность синтеза А", в масштабе 0,400 ммоль с использованием "Способа В циклизации" вместо "Способа А циклизации". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; градиент: 10-50% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 75,1 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия анализа А: время удержания = 1,408 мин; ESI-MS(+) m/z 961,40 (M-2H).

Условия анализа В: время удержания = 2,912 мин; ESI-MS(+) m/z 963,45 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: расчетное значение: 962,9618 выявленное значение: 962,9592.

Пример 5007 получали следующим образом. В 1 мензурку, оснащенную якорем для магнитной мешалки и загруженную промежуточным соединением 5007 (49 мг, 0,025 ммоль), добавляли NMP (1,00 мл), затем DIPEA (0,043 мл, 0,25 ммоль), затем HATU (23 мг, 0,062 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. В реакционный раствор добавляли MeNH₃Cl (5 мг) и HATU (10 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. К раствору добавляли AcOH (3 капли). Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом

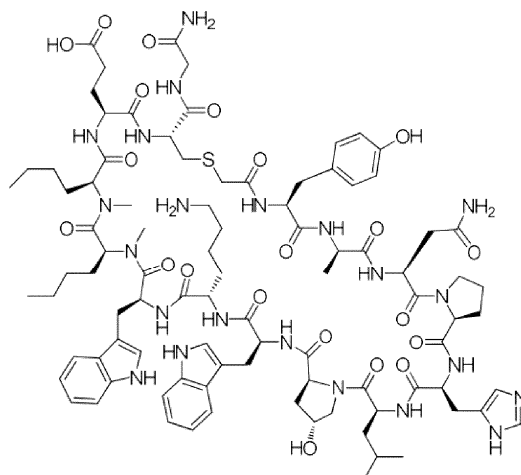
аммония; градиент: 15-55% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 3,3 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 97%.

Условия анализа А: время удержания = 1,55 мин; ESI-MS(+) m/z 952,3 (M-2H).

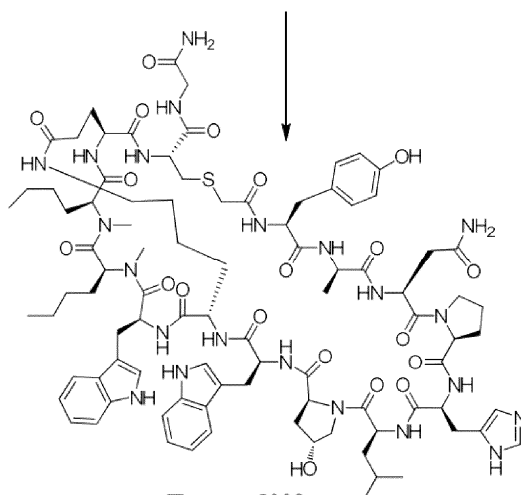
Условия анализа В: время удержания = 2,68 мин; ESI-MS(+) m/z 954,3 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z : расчетное значение: 953,9565 выявленное значение: 953,9542.

Получение примера 5008



Промежуточное соединение 5008



Пример 5008

Промежуточное соединение 5008 получали, следуя разделу "Общая последовательность синтеза А", в масштабе 0,400 ммоль с использованием "Способа В циклизации" вместо "Способа А циклизации". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 15-55% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 122,4 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 97%.

Условия анализа А: время удержания = 1,55 мин; ESI-MS(+) m/z 957,5 (M+2H).

Условия анализа В: время удержания = 1,82 мин; ESI-MS(+) m/z 954,5 (M-2H).

ESI-HRMS(+) m/z : расчетное значение: 955,9577, выявленное значение: 955,9543.

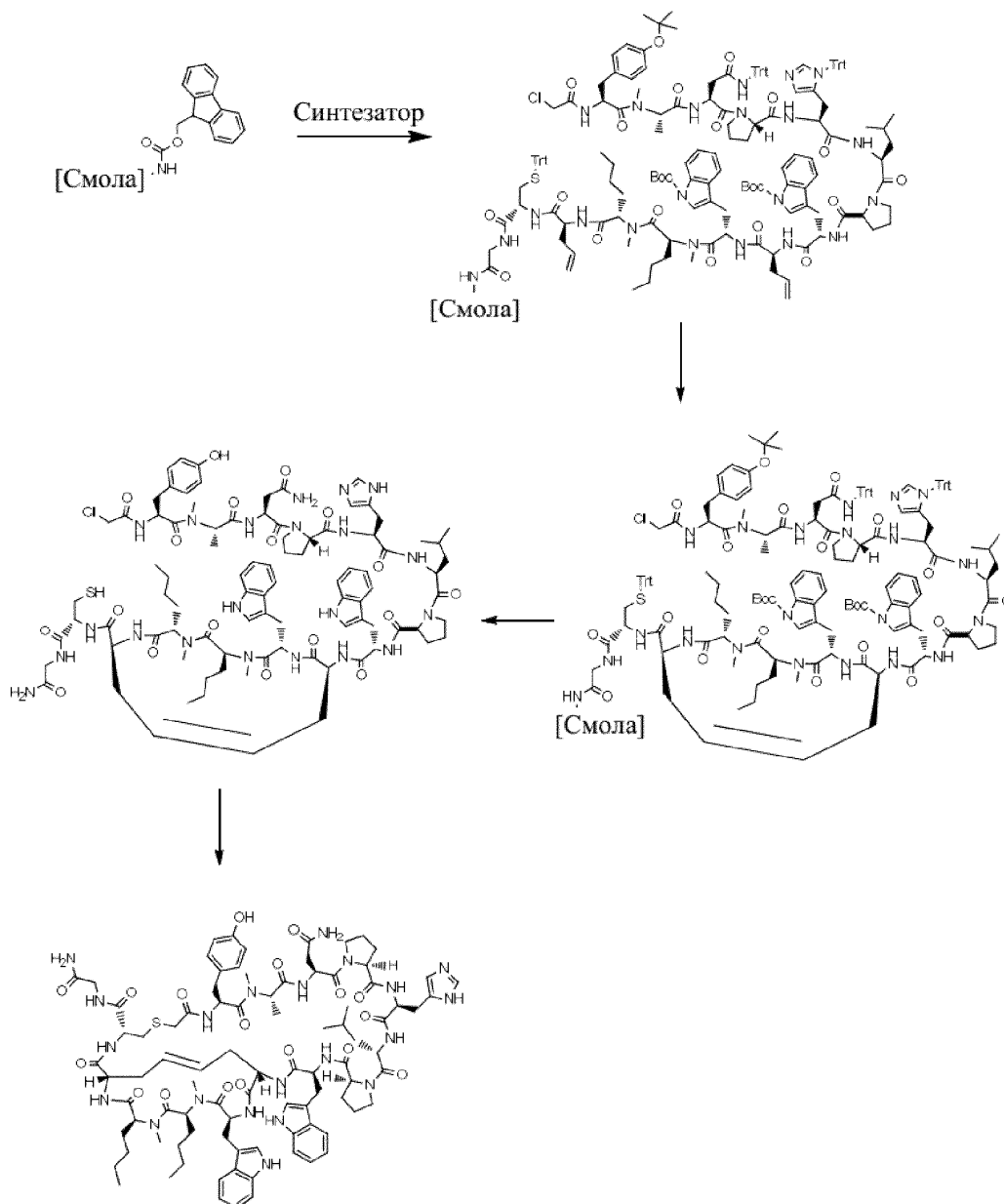
Пример 5008 получали следующим образом. В 1 мензурку, оснащенную якорем для магнитной мешалки и загруженную промежуточным соединением 5008 (46 мг, 0,023 ммоль), добавляли NMP (1,00 мл), затем DIPEA (0,041 мл, 0,23 ммоль), затем HATU (22 мг, 0,058 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. В реакционный раствор добавляли MeNH₃Cl (5 мг) и HATU (10 мг). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем к раствору добавляли AcOH (3 капли). Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммо-

ния; градиент: 20-60% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 50-100% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 1,7 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия анализа Е: время удержания = 1,833 мин; ESI-MS(+) m/z 948,15 (M+2H).

Условия анализа В: время удержания = 2,545 мин; ESI-MS(+) m/z 946,55 (M+2H).

Получение примера 7155



Пример 7155

Пример 7155 получали в масштабе 100 мкмоль × 4, следуя общей последовательности синтеза, которая описана для получения примера 5001 и состоит из следующих общих процедур: "Способ А с применением прибора Prelude: процедура набухания смолы", "Способ А с применением прибора Prelude: процедура связывания с одной группой", "Способ А с применением прибора Prelude: процедура связывания с двумя группами", "Способ А с применением прибора Prelude: процедура связывания с хлорацетилхлоридом".

К полученному в результате связанному со смолой соединению (100 мкмоль) в пузырьке для нагревания в микроволновой печи добавляли 1 экв. (100 мкМ, 63 мг) катализатора Ховейды-Граббса второго

поколения и 17 мл дихлорметана. Пузырек запечатывали и смесь подвергали дегазации/продуванию азотом, а затем подвергали нагреванию в микроволновой печи при 120°C в течение 1 ч. Реакцию повторяли 4 раза, полученную в результате смолу объединяли в сосуде для твердофазного синтеза, фильтровали, промывали DMF (4 × 20 мл), затем DCM (5 × 20 мл) и сушили в вакууме в течение ночи. Материал делили на четыре партии по 100 мкмоль.

Затем использовали "Способ А полного снятия защитных групп" и "Способ А циклизации".

Способ А полного снятия защитных групп. Процедура из "Способа А полного снятия защитных групп" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 100 мкмоль × 4, при этом масштаб определяется количеством линкера Ринка, связавшегося со смолой. "Раствор для снятия защитных групп" готовили посредством объединения в стеклянной банке на 40 мл трифторуксусной кислоты (22 мл), фенола (1,325 г), воды (1,25 мл) и триизопропилсилан (0,5 мл). К смоле, содержащейся в пузырьке для твердофазного синтеза, добавляли "раствор для снятия защитных групп" (8,0 мл). Смесь перемешивали на орбитальном шейкере (175 об/мин в течение 2 ч). Смесь фильтровали, твердые вещества промывали дополнительным "раствором для снятия защитных групп" (4,0 мл) и собирали в 40 мл пузырьке с винтовой крышкой. К объединенным фильтратам добавляли Et₂O (15 мл). Смесь интенсивно перемешивали, при этом осаждалось значительное количество белого твердого вещества. Смесь центрифугировали в течение 3 мин при 2000 об/мин, раствор сцеживали из твердых веществ и сливали. Процесс повторяли три раза, твердым веществам затем позволяли осесть на месте и сушили на воздухе в течение 1-2 ч перед осуществлением получения неочищенного соединения в виде грязно-белого твердого вещества.

Способ А циклизации. Процедура "Способа А циклизации" описывает эксперимент, осуществляемый в масштабе 100 мкмоль × 4. Твердые неочищенные соединения растворяли в MeCN:водн. 0,1M NH₄OAc (60 мл:60 мл) и раствор затем тщательно доводили до pH 9,0 с использованием водного NaOH (1,0 M). Пузырьки накрывали крышкой и раствор затем перемешивали при 175 об/мин на орбитальном шейкере в течение ночи (~18 ч). Реакционный раствор концентрировали и остаток затем растворяли в MeOH.

Неочищенное соединение очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 5 мкм, 19 × 200 мм, подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 15-55% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 3,0 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 84%.

Условия анализа А: время удержания = 1,63 мин; ESI-MS(+) m/z = 909,5 (M + 2H).

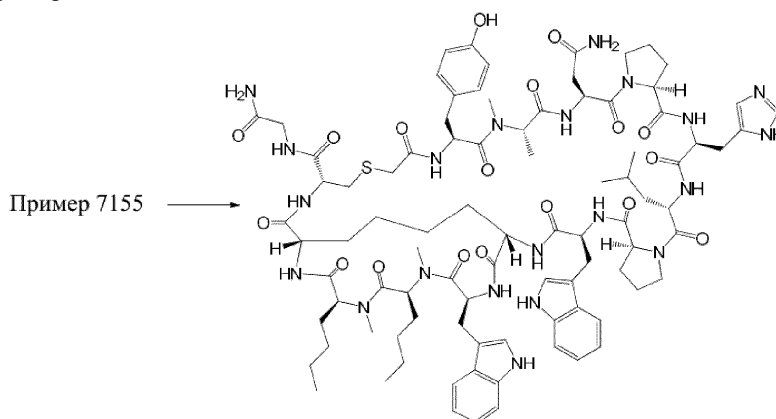
Условия анализа В: время удержания = 2,70 мин; ESI-MS(+) m/z = 909,5 (M + 2H).

Следующие условия LC/MS анализа использовали для определения окончательной чистоты.

Условия анализа А: колонка: Waters BEH C18, 2,0 × 50 мм, частицы с диаметром 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; температура: 50°C; градиент: 0% В, 0-100% В за 3 мин, затем выдерживание в течение 0,5 мин в 100% В; поток: 1 мл/мин; выявление: в УФ при длине волны 220 нм.

Условия анализа В: колонка: Waters BEH C18, 2,0 × 50 мм, частицы с диаметром 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 mM ацетатом аммония; температура: 50°C; градиент: 0% В, 0-100% В за 3 мин, затем выдерживание в течение 0,5 мин в 100% В; поток: 0,5 мл/мин; выявление: в УФ при длине волны 220 нм.

Получение примера 7156



В круглодонную колбу добавляли 3,0 мг примера 7155 (1,65 мкмоль) и 2 мл метанола. Колбу запечатывали и раствор подвергали дегазации и продували азотом. К раствору затем добавляли 1 экв. 10% Pd/C, колбу оснащали баллоном водорода и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученный в результате продукт фильтровали и очищали с помощью препаративной LC/MS со

следующими условиями: колонка: XBridge C18, 5 мкм, 19 × 200 мм, подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетатом аммония; градиент: 45-85% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 1,7 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия анализа А: время удержания = 1,69 мин; ESI-MS(+) m/z = 910,5 (M + 2H).

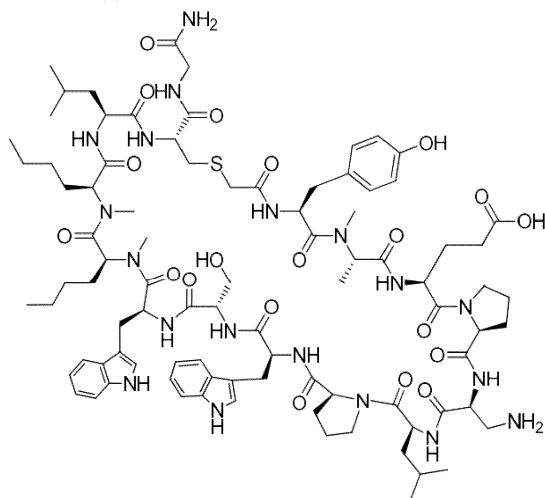
Условия анализа В: время удержания = 2,70 мин; ESI-MS(+) m/z = 910,5 (M + 2H).

Следующие условия LC/MS анализа использовали для определения окончательной чистоты.

Условия анализа А: колонка: Waters BEH C18, 2,0 × 50 мм, частицы с диаметром 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 50°C; градиент: 0% В, 0-100% В за 3 мин, затем выдерживание в течение 0,5 мин в 100% В; поток: 1 мл/мин; выявление: в УФ при длине волны 220 нм.

Условия анализа В: колонка: Waters BEH C18, 2,0 × 50 мм, частицы с диаметром 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 50°C; градиент: 0% В, 0-100% В за 3 мин, затем выдерживание в течение 0,5 мин в 100% В; поток: 0,5 мл/мин; выявление: в УФ при длине волны 220 нм.

Получение промежуточного соединения 10500



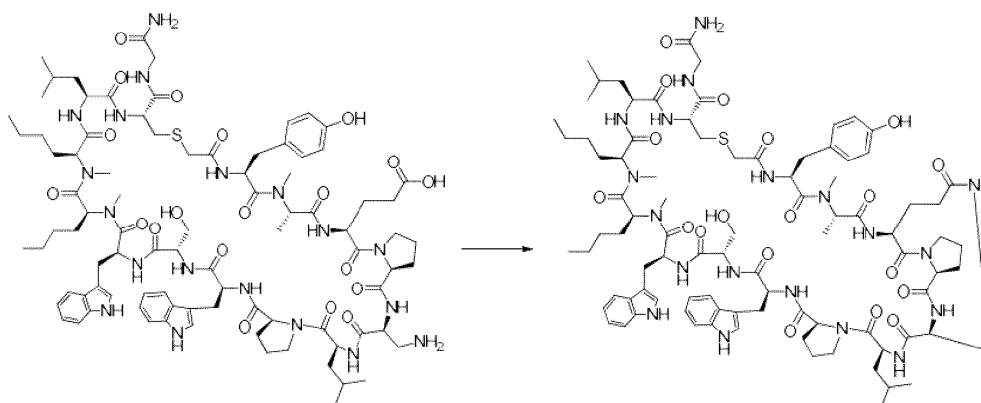
Промежуточное соединение 10500

Промежуточное соединение 10500 получали, следуя "Общей последовательности синтеза А", но при использовании "Способа В циклизации" вместо "Способа А циклизации". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS в следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетатом аммония; градиент: 40-80% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; градиент: 10-50% В за 40 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 25,8 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 99%.

Условия анализа А: время удержания = 1,66 мин; ESI-MS(+) m/z 908,4 (M+2H).

Условия анализа В: время удержания = 2,81 мин; ESI-MS(+) m/z 908,4 (M+2H).

Получение примера 10500



Промежуточное соединение 10500

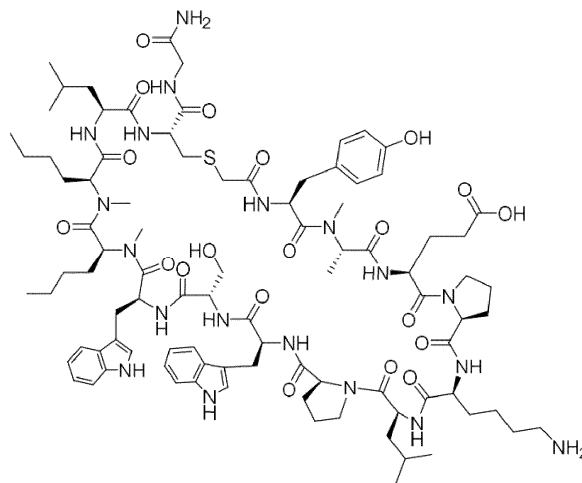
Пример 10500

Промежуточное соединение 10500 (15 мг, 8,26 мкмоль) растворяли в DMF (1 мл) с последующим добавлением основания Хунига (7,22 мкл, 0,041 ммоль), а затем HATU (4,71 мг, 0,012 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 30-70% B за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% B; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 1,2 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 99%.

Условия анализа A: время удержания = 1,85 мин; ESI-MS(+) m/z 899,5 (M+2H).

Условия анализа B: время удержания = 2,98 мин; ESI-MS(+) m/z 899,7 (M+2H).

Получение промежуточного соединения 10501



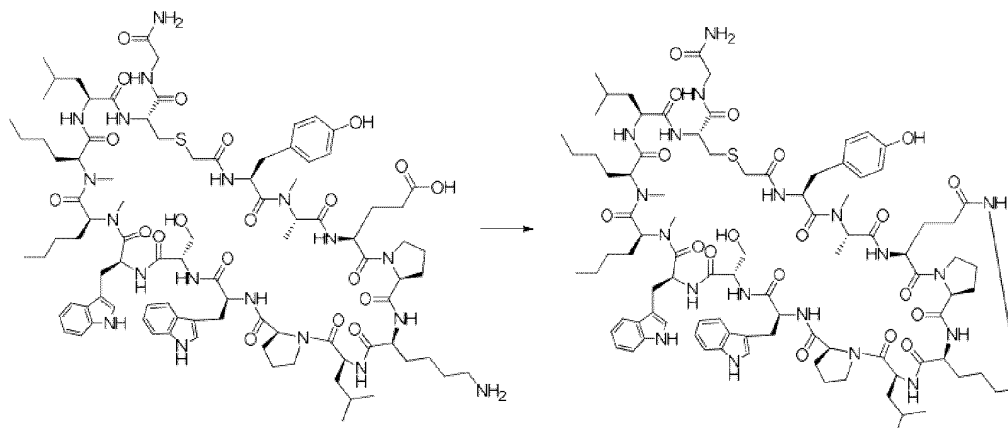
Промежуточное соединение 10501

Промежуточное соединение 10501 получали, следуя разделу "Общая последовательность синтеза A". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 15-55% B за 30 мин, затем 5-минутное выдерживание при 100% B; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 34,0 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия анализа A: время удержания = 1,64 мин; ESI-MS(+) m/z 929,4 (M+2H).

Условия анализа B: время удержания = 2,82 мин; ESI-MS(+) m/z 929,8 (M+2H).

Получение примера 10501



Промежуточное соединение 10501

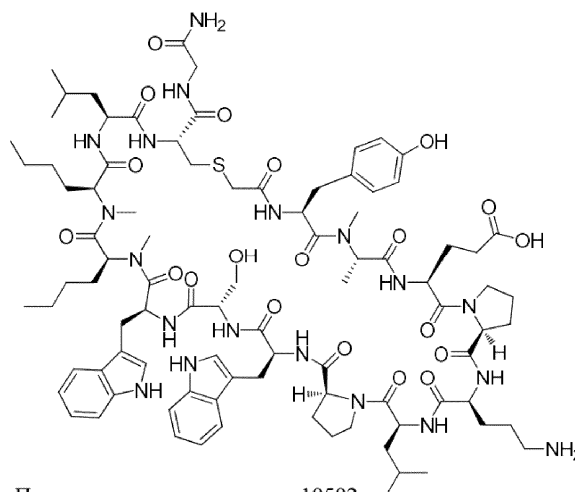
Пример 10501

Пример 10501 получали, следуя способу, применяемому для получения примера 10500. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; градиент: 25-65% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 6,5 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия анализа А: время удержания = 1,75 мин; ESI-MS(+) m/z 920,6 (M+2H).

Условия анализа В: время удержания = 2,88 мин; ESI-MS(+) m/z 920,6 (M+2H).

Получение промежуточного соединения 10502



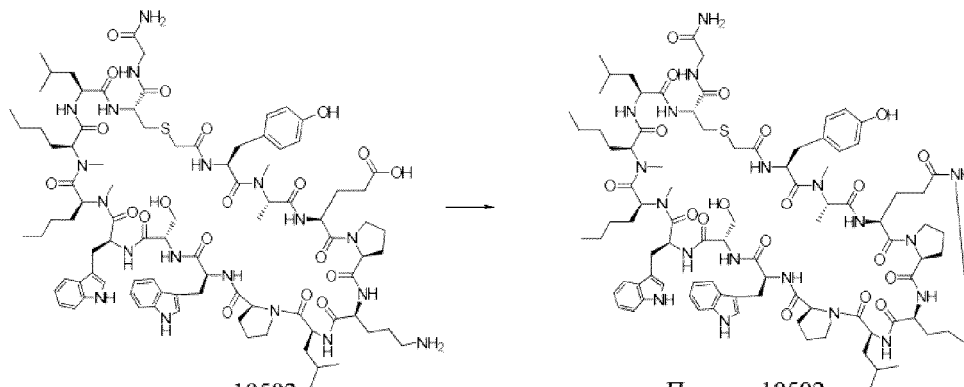
Промежуточное соединение 10502

Промежуточное соединение 10502 получали, следуя разделу "Общая последовательность синтеза А". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; градиент: 15-55% В за 30 мин, затем 5-минутное выдерживание при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 34,0 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия анализа А: время удержания = 1,68 мин; ESI-MS(+) m/z 922,5 (M+2H).

Условия анализа В: время удержания = 2,83 мин; ESI-MS(+) m/z 922,8 (M+2H).

Получение примера 10502



Промежуточное соединение 10502

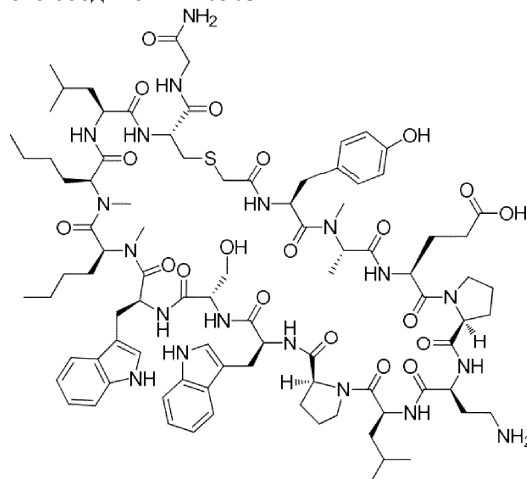
Пример 10502

Пример 10502 получали, следуя способу, применяемому для получения примера 10500. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 25-65% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 3,1 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 98%.

Условия анализа А: время удержания = 1,77 мин; ESI-MS(+) m/z 913,4 (M+2H).

Условия анализа В: время удержания = 2,88 мин; ESI-MS(+) m/z 913,7 (M+2H).

Получение промежуточного соединения 10503



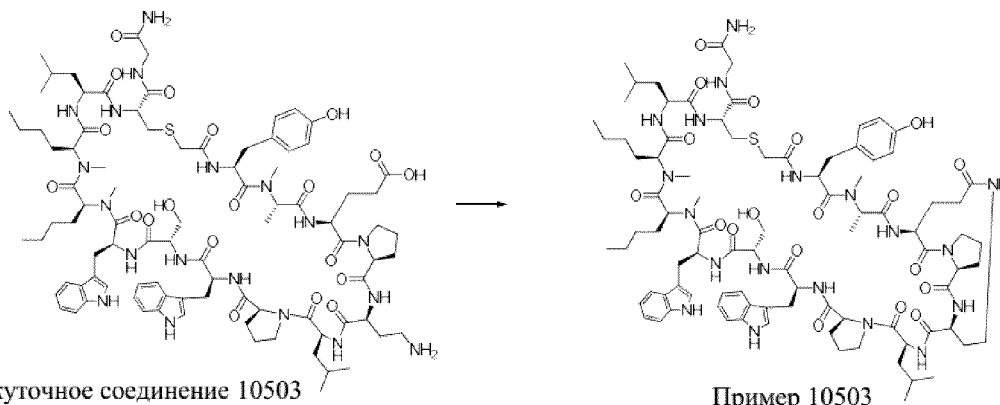
Промежуточное соединение 10503

Промежуточное соединение 10503 получали, следуя разделу "Общая последовательность синтеза А". Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 15-55% В за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 23,4 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия анализа А: время удержания = 1,65 мин; ESI-MS(+) m/z 915,8 (M+2H).

Условия анализа В: время удержания = 2,84 мин; ESI-MS(+) m/z 915,8 (M+2H).

Получение примера 10503



Промежуточное соединение 10503

Пример 10503

Пример 10503 получали, следуя способу, применяемому для получения примера 10500. Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19 × 200 мм, частицы с диаметром 5 мкм; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 25-65% B за 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин в 100% B; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и сушили с помощью центробежного испарителя. Выход продукта составлял 1,8 мг, и его чистота, оцененная с помощью LCMS анализа, составляла 100%.

Условия анализа A: время удержания = 1,78 мин; ESI-MS(+) m/z 906,8 (M+2H).

Условия анализа B: время удержания = 2,92 мин; ESI-MS(+) m/z 906,7 (M+2H).

Способы исследования способности макроциклических соединений к конкуренции за связывание PD-1 с PD-L1 с применением анализа связывания с помощью гомогенной флуоресценции с временным разрешением

Способность макроциклических соединений согласно настоящему раскрытию к связыванию с PD-L1 изучали с применением анализа связывания PD-1/PD-L1 с помощью гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF).

Способы.

Анализ связывания растворимого PD-1 с растворимым PD-L1 с помощью гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF). Растворимый PD-1 и растворимый PD-L1 относятся к белкам с усеченными на карбоксильном конце, которые удаляют трансмембранные участки и являются слитыми с гетерологичными последовательностями, в частности с Fc-частью последовательности человеческого иммуноглобулина G (Ig) или с гексагистидиновой эпитопной меткой (His). Все исследования связывания осуществляли в буфере для HTRF анализа, состоящем из dPBS, дополненного 0,1% (мас./об.) бычьего сывороточного альбумина и 0,05% (об./об.) Tween-20. В случае анализа связывания PD-1-Ig/PD-L1-His ингибиторы подвергали предварительному инкубированию 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 дальнейшим инкубированием в течение 15 мин. Применяли слитые белки на основе PD-L1 человека, яванских макаков, мыши или другого вида. Выявление HTRF осуществляли с использованием моноклонального антитела к Ig, меченного криплатом европия (конечная концентрация 1 нМ), и моноклонального антитела к His, меченного аллофикоцианином (APC) (конечная концентрация 20 нМ). Антитела разводили в буфере для выявления HTRF и 5 мкл дозировали сверху реакционной смеси для реакции связывания. Реакционной смеси давали уравновеситься в течение 30 мин и сигнал (соотношение 665/620 нм) получали с применением флуориметра EnVision. Проводили дополнительные анализы связывания между PD-1-Ig/PD-L2-His (20 и 5 нМ соответственно), CD80-His/PD-L1-Ig (100 и 10 нМ соответственно) и CD80-His/CTLA4-Ig (10 и 5 нМ соответственно). Исследования связывания/конкуренции между биотинилированным соединением № 71 и человеческим PD-L1-His осуществляли следующим образом. Макроциклические соединения-ингибиторы подвергали предварительному инкубированию 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 уравновеситься в течение 30 мин с последующим добавлением меченого криплатом европия стрептавида (конечная концентрация 2,5 пМ) и меченого APC антитела к His (конечная концентрация 20 нМ) в 5 мкл буфера для HTRF. Реакционной смеси давали уравновеситься в течение 30 мин и сигнал (соотношение 665/620 нм) получали с применением флуориметра EnVision.

Рекомбинантные белки. Человеческий PD-1 с усеченным карбоксильным концом (аминокислоты 25-167) и С-концевой эпитопной меткой человеческого Ig [hPD-1 (25-167)-3S-IG] и человеческий PD-L1 (аминокислоты 18-239) с С-концевой эпитопной меткой His [hPD-L1(19-239)-сайт расщепления протеазой вируса крапчатости жилок табака (TVMV)-His] экспрессировали в HEK293T клетках и последова-

тельно очищали с помощью аффинной хроматографии с рекомбинантным белком А и гель-хроматографии. Все из человеческого PD-L2-His (Sino Biologicals), CD80-His (Sino Biologicals), CTLA4-Ig (RnD Systems) получали из коммерческих источников.

Последовательность рекомбинантного человеческого PD-1-Ig

hPD1(25-167)-3S-IG

```

1      LDSPDRPWNF PTFSPALLVV TEGDNATFTC SFSNTSESFV LNWMRMSPSN
51     QTDKLAAPFE DRSQPGQDCR FRVTQLPNGR DFHMSVVRAR RNDSGTYLCG
101    AISLAPKAQI KESLRAELRV TERRAEVPTA HPSPSPRPAG QFQGSPPGGGG
151    GREPKSSDKT HTSPSPPAPE LLGGSSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
201    VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
251    LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
301    SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD
351    KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

```

(SEQ ID NO:1)

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

hPD1(19-239)-TVMV-His

```

1      FTVTVPKDLY VVEYGSNMTI ECKFPVEKQL DLAALIVYWE MEDKNIIQFV
51     HGEEDLKVQH SSYRQARLL KDQLSLGNAA LQITDVKLQD AGVYRCMISY
101    GGADYKRITV KVNAPYNKIN QRILVVDVPT SEHELTCQAE GYPKAEVIWT
151    SSDHQVLSGK TTTTNSKREE KLFNVTSTLR INTTNEIFY CTFRRLDPEE
201    NHTAELVIPE LPLAHPNER TGSSETVRFQ GHHNNHH

```

(SEQ ID NO:2)

Результаты представлены в таблице. Как показано, макроциклические соединения согласно настоящему раскрытию демонстрировали сильное ингибирование активности связывания PD-1-Ig с PD-L1-TVMV-His (PD-L1-His). Диапазоны являются следующими: A=0,10-1 мкМ; B=0,01-0,099 мкМ; C=0,003-0,0099 мкМ.

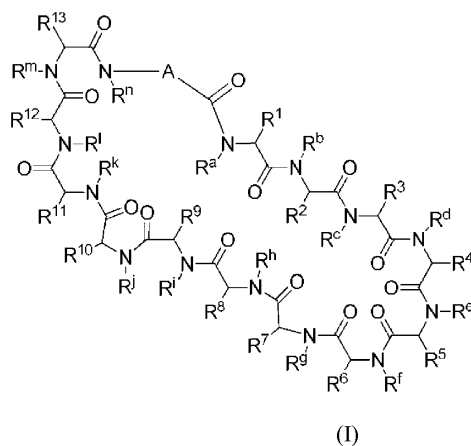
Номер примера	IC ₅₀ (мкМ) согласно HTRF
5001	C
5002	B
5003	B
5004	C
1400	B
1401	B
1402	B
10500	A
10501	A
10502	A
10503	A
5005	B

7155	B
1403	0,007
1404	C
1405	B
1500	B
1501	B
1502	--
1503	0,993
1504	B
1505	B
1506	B
1507	B
1508	B
5006	B
5007	0,014
5008	C
7156	B

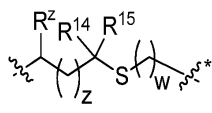
Специалисту в данной области техники будет очевидно, что изобретение не ограничивается выше-изложенными иллюстративными примерами и что оно может быть осуществлено в других конкретных формах без отступления от его главных признаков. Следовательно, желательно, чтобы примеры рассматривались во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие, при этом делается ссылка на пункты приложенной формулы изобретения, а не на предыдущие примеры, и предполагается, что все изменения, которые относятся к значению и диапазону эквивалентности пунктов формулы изобретения, охватываются ими.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль, причем А представляет собой



причем обозначает точку прикрепления к карбонильной группе и обозначает точку прикрепления к атому азота;

z равно 0, 1 или 2;

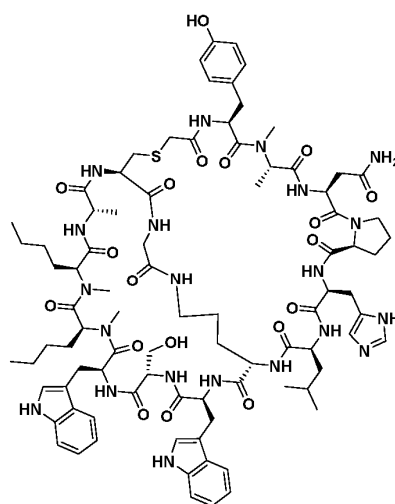
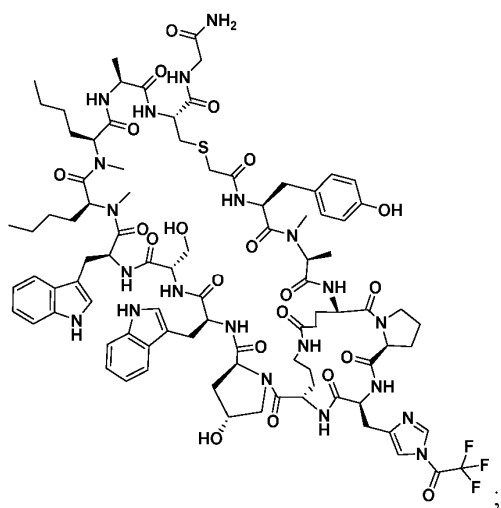
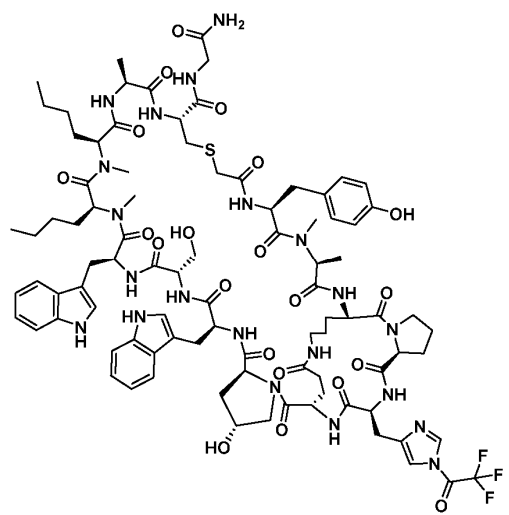
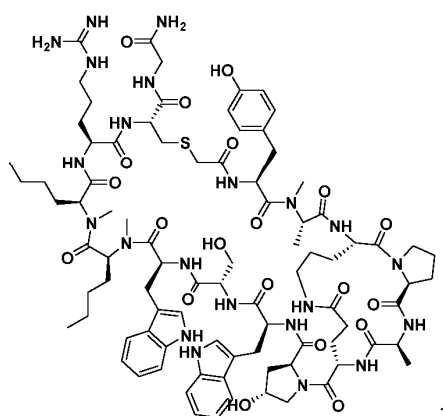
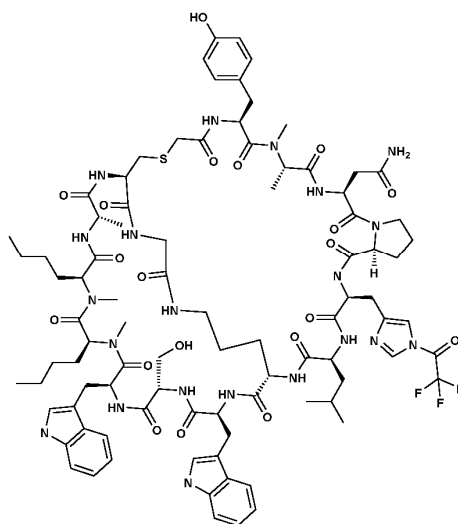
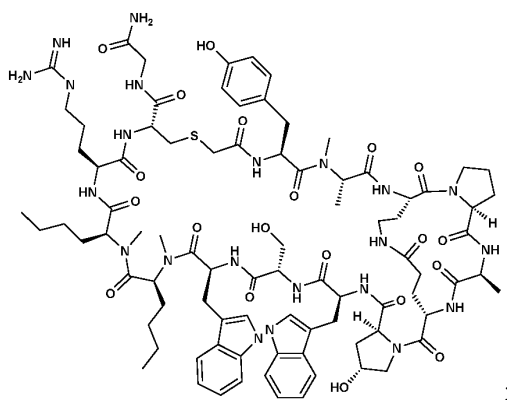
w равно 1 или 2;

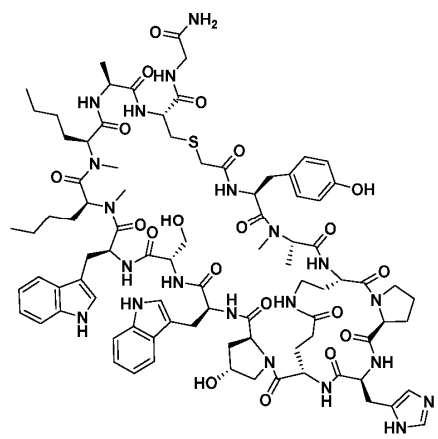
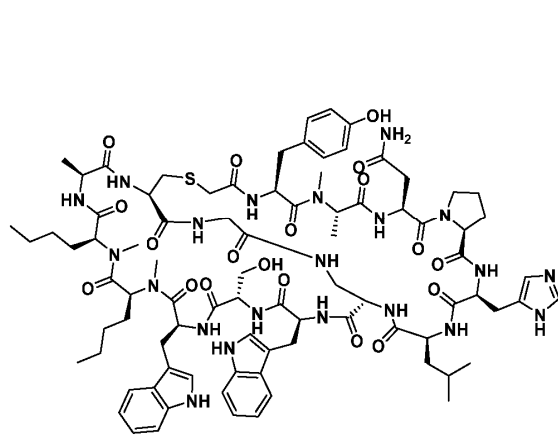
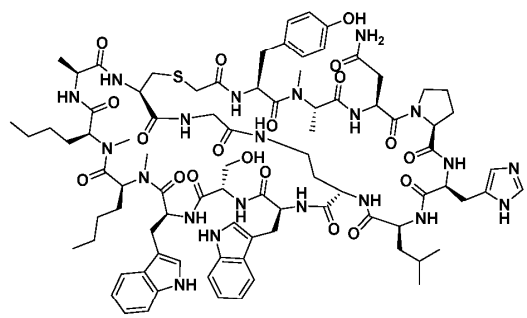
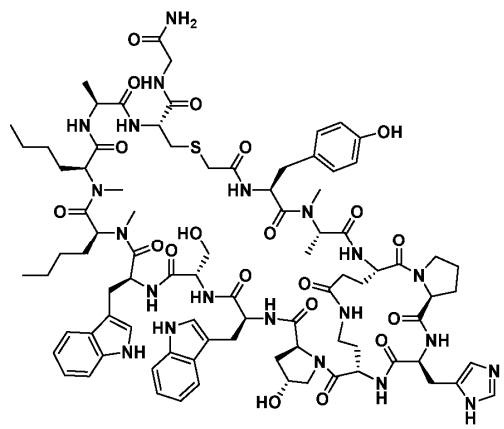
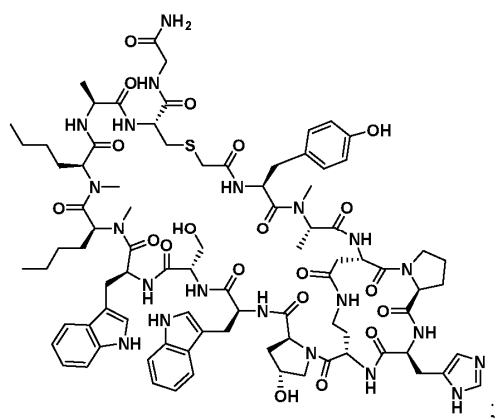
R¹⁴ и R¹⁵ независимо выбраны из водорода и метила; и

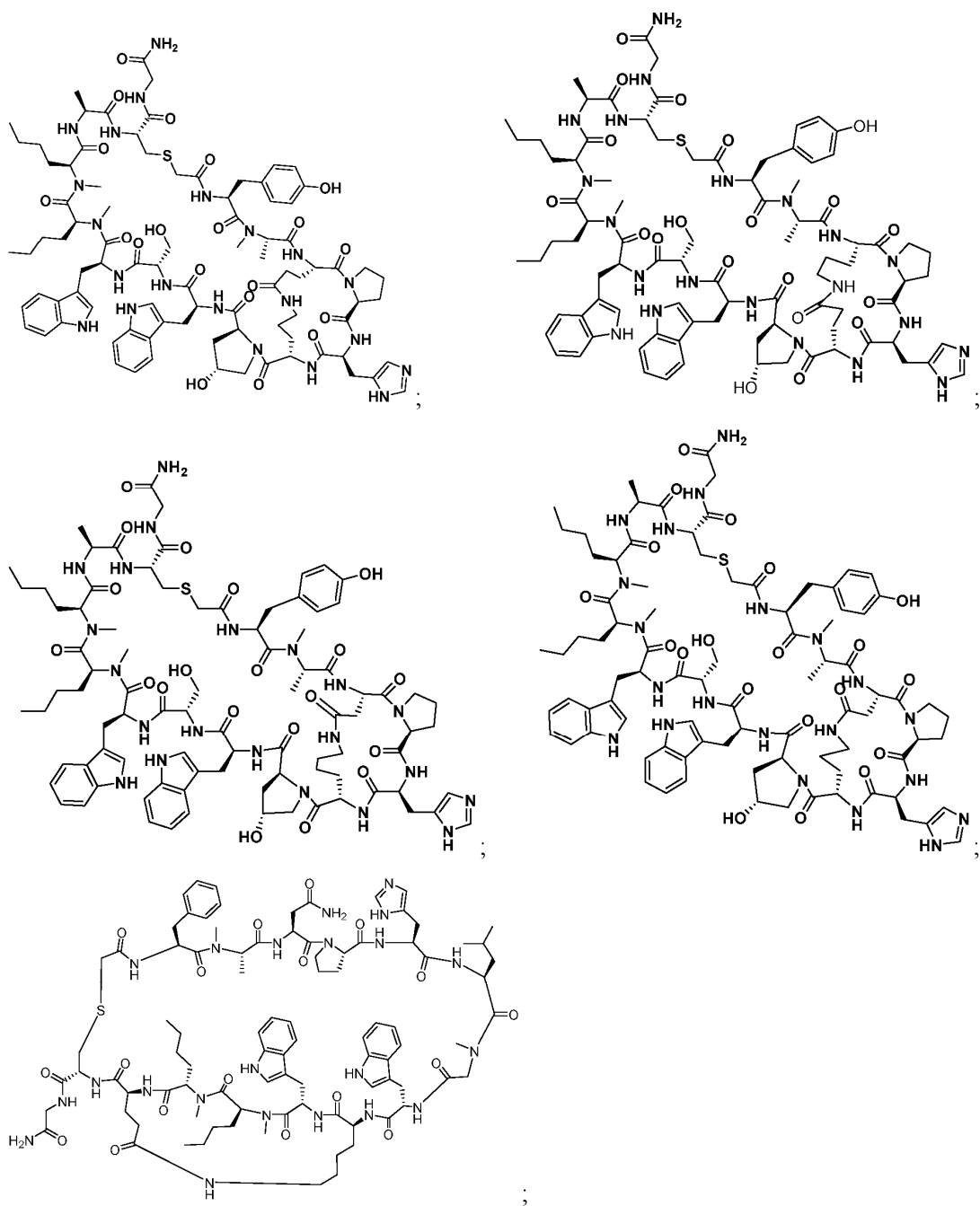
R¹⁶ выбран из водорода и -C(O)NHR¹⁶; при этом R¹⁶ выбран из водорода, -CHR¹⁷C(O)NH₂, -CHR¹⁷C(O)NHCHR¹⁸C(O)NH₂ и -CHR¹⁷C(O)NHCHR¹⁸C(O)NHCH₂C(O)NH₂; при этом R¹⁷ выбран из водорода и -CH₂OH и при этом R¹⁸ выбран из водорода и метила;

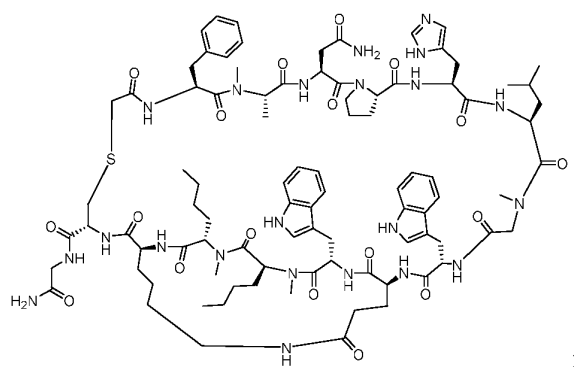
каждый из R^a и R^j независимо выбран из водорода и метила;

- R^c , R^f , R^h , R^i , R^m и R^n представляют собой водород;
 R^1 представляет собой фенил C_1 - C_3 алкил, при этом фенил незамещен или замещен гидроксигруппой;
 R^2 представляет собой C_1 - C_7 алкил;
 R^3 представляет собой $-CH_2C(O)NH_2$, или R^3 и R^6 вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, ноль или одну двойную связь, и ноль, одну или две группы, выбранные из $-C(O)NH-$ и $-NHC(O)-$; или R^3 и R^5 вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, ноль или одну двойную связь и ноль, одну или две группы, выбранные из $-C(O)NH-$ и $-NHC(O)-$;
 R^4 и R^d , вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют пирролидиновое кольцо;
 R^5 выбран из C_1 - C_7 алкила и $-CH_2$ (имидазолила), замещенного ноль или одной группой $CF_3C(O)-$, или R^3 и R^5 вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, ноль или одну двойную связь, и ноль, одну или две группы, выбранные из $-C(O)NH-$ и $-NHC(O)-$;
 R^6 выбран из C_1 - C_7 алкила и $-(CH_2)_2C(O)NH_2$, или R^3 и R^6 вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, ноль или одну двойную связь, и ноль, одну или две группы, выбранные из $-C(O)NH-$ и $-NHC(O)-$;
 R^7 представляет собой водород, или R^7 и R^g , вместе с атомами, к которым они прикреплены, образуют пирролидиновое кольцо, замещенное ноль или одной гидроксигруппой, или R^7 и R^{16} вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, ноль или одну двойную связь, и ноль, одну или две группы, выбранные из $-C(O)NH-$ и $-NHC(O)-$;
 R^8 представляет собой $-(CH_2)$ индолил;
 R^9 выбран из гидроксиметила и $-CH_2CH_2CO_2H$, или R^9 и R^{13} вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, ноль или одну двойную связь, и ноль, один или две группы, выбранные из $-C(O)NH-$ и $-NHC(O)-$;
 R^{10} выбран из $-(CH_2)$ индолила и $-(CH_2)$ бензотиенила, каждый из которых замещен ноль или одной $-CH_2CO_2H$ группой;
 R^{11} представляет собой C_1 - C_7 алкил;
 R^{12} представляет собой C_1 - C_7 алкил;
 R^{13} выбран из C_1 - C_7 алкила и $-(CH_2)_3NHC(NH)NH_2$, или R^9 и R^{13} вместе образуют мостик, содержащий от 2 до 7 атомов углерода, ноль или одну двойную связь, и ноль, одну или две группы, выбранные из $-C(O)NH-$ и $-NHC(O)-$, при условии, что по меньшей мере один из R^3 и R^6 ; R^9 и R^{13} , и R^7 и R^{16} образует мостик;
 R^b представляет собой метил;
 R^c представляет собой водород или метил;
 R^e представляет собой водород или метил, или R^e и R^7 вместе с атомами, к которым они присоединены, могут образовывать пирролидиновое кольцо, замещенное ноль или одной гидроксигруппой;
 R^k представляет собой водород или метил; и
 R^l представляет собой метил.
2. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, причем
- z равно 0;
 w равно 1;
 R^{14} и R^{15} представляют собой водород; и
 R^z представляет собой $-C(O)NHR^{16}$.
3. Соединение, выбранное из

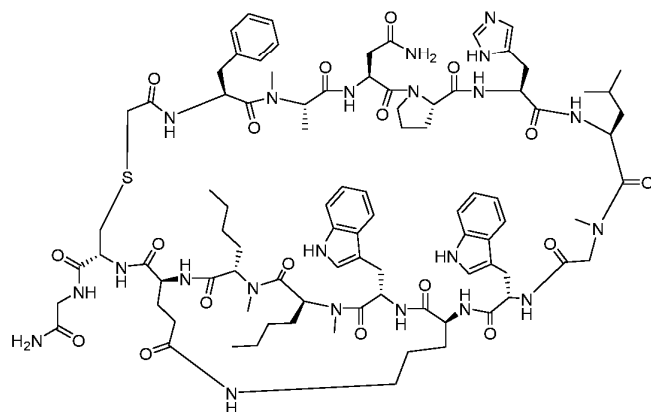




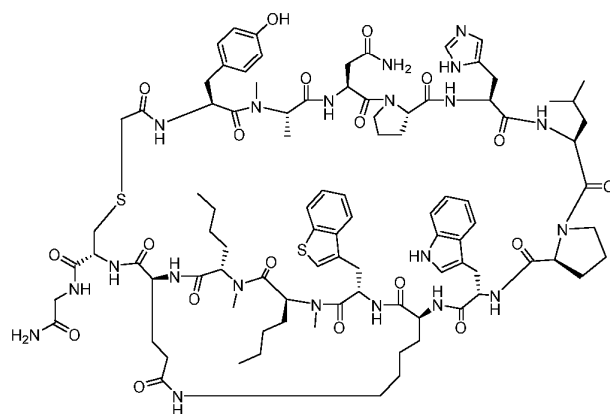




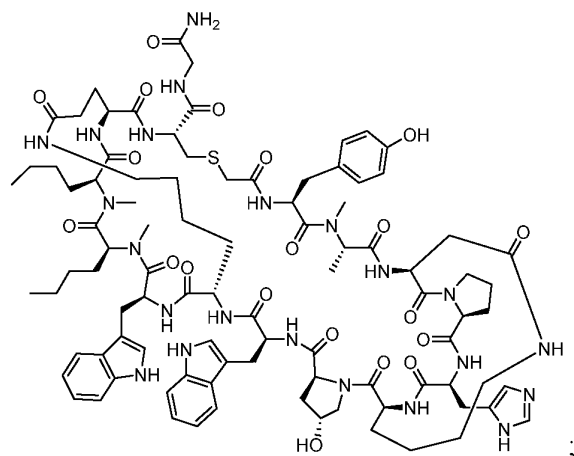
;



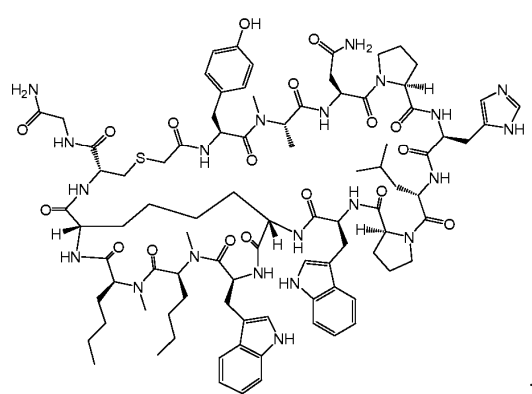
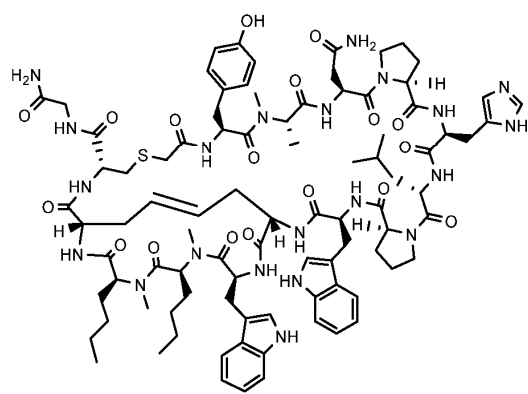
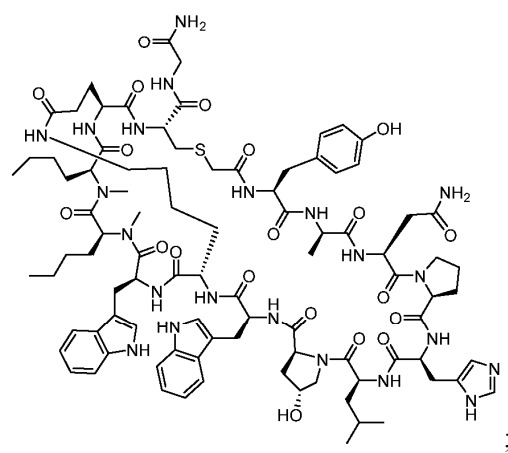
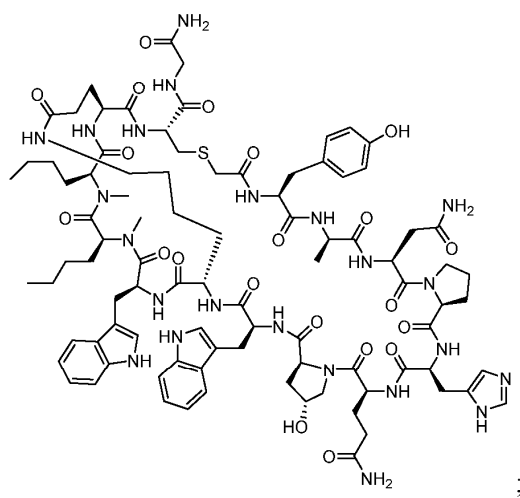
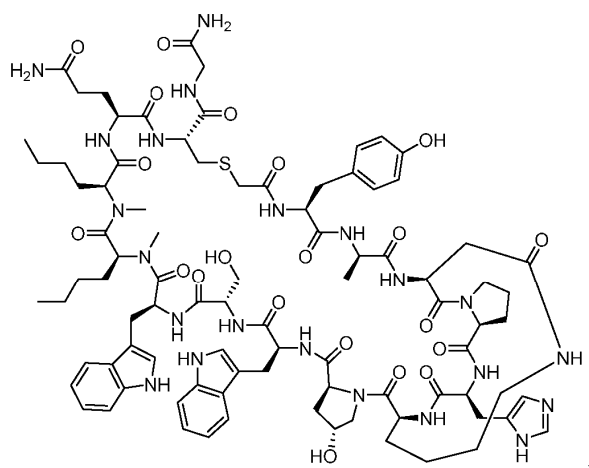
;

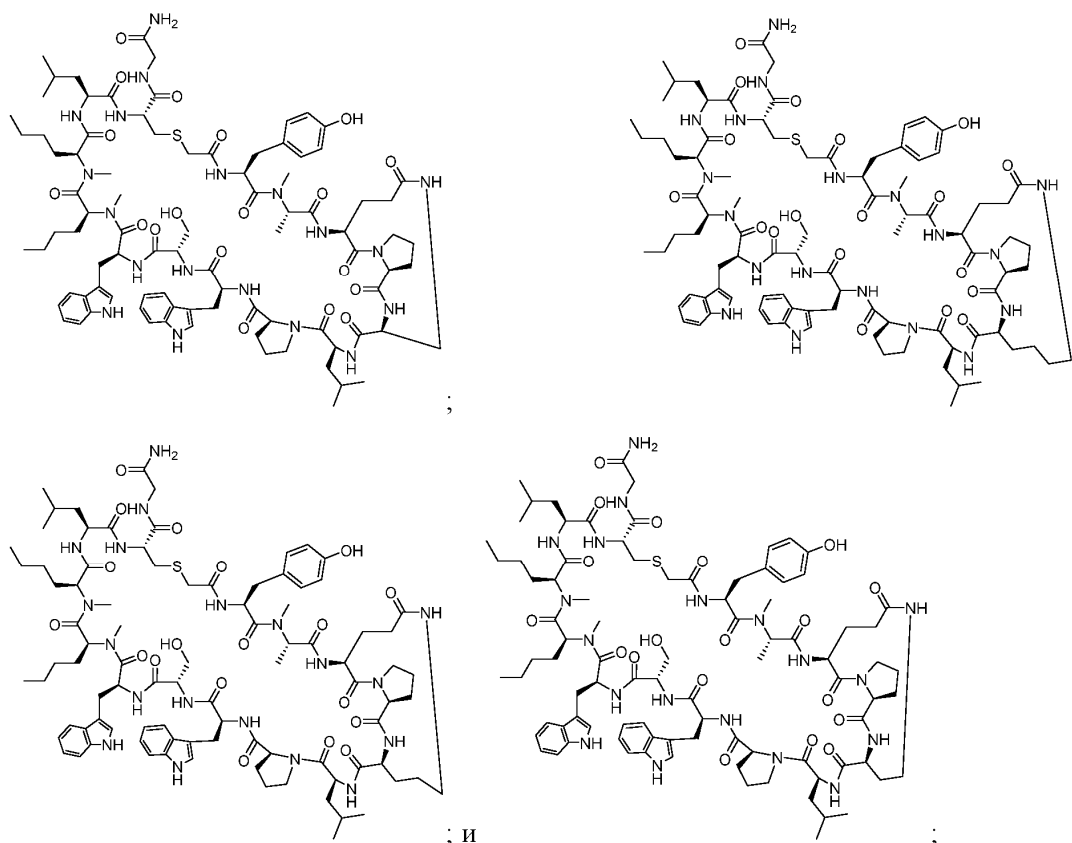


;



;





или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Применение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-3 или его фармацевтически приемлемой соли для усиления, стимуляции и/или повышения иммунной реакции у субъекта, нуждающегося в этом.

5. Применение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-3 или его фармацевтически приемлемой соли для ингибирования роста, пролиферации или метастазирования клеток рака у субъекта, нуждающегося в этом.

6. Применение по п.5, причем рак выбран из меланомы, почечно-клеточной карциномы, ороговевающего немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), неороговевающего NSCLC, злокачественной опухоли толстой и прямой кишки, кастрационно-резистентной злокачественной опухоли предстательной железы, злокачественной опухоли яичника, злокачественной опухоли желудка, печеночно-клеточной карциномы, карциномы поджелудочной железы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, карцином пищевода, желудочно-кишечного тракта и молочной железы и гематологических злокачественных опухолей.

7. Применение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-3 или его терапевтически приемлемой соли для лечения инфекционного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом.

8. Применение по п.7, причем инфекционное заболевание вызвано вирусом.

9. Применение по п.8, причем вирус выбран из ВИЧ, гепатита А, гепатита В, гепатита С, вирусов герпеса и гриппа.

10. Применение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-3 или его терапевтически приемлемой соли для лечения септического шока у субъекта, нуждающегося в этом.

11. Применение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-3 или его терапевтически приемлемой соли для блокирования взаимодействия PD-L1 с PD-1 и/или CD80 у субъекта.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2