

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092388 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.12.22

(51) Int. Cl. C07K 14/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 17/08 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.02

(54) ГЕТЕРОТАНДЕМНЫЕ БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

(31) 1805492.4; 1820981.7

(72) Изобретатель:

(32) 2018.04.04; 2018.12.21

Кин Николас, Макдоннелл Кевин,
Парк Питер, Упадхийа Пунит, Мадд
Джемма (GB)

(33) GB

(86) PCT/GB2019/050951

(87) WO 2019/193328 2019.10.10

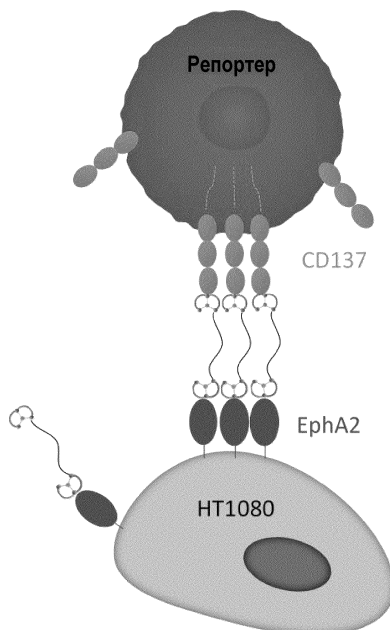
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

БАЙСИКЛТЭКС ЛИМИТЕД (GB)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к гетеротандемным бициклическим пептидным комплексам, которые содержат первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на иммунной клетке, конъюгированный через линкер со вторым пептидным лигандом, который связывается с компонентом, присутствующим на раковой клетке. Изобретение также относится к применению указанных гетеротандемных бициклических пептидных комплексов в профилактике, подавлении или лечении рака.



A1

202092388

202092388

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565121EA/042

ГЕТЕРОТАНДЕМНЫЕ БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к гетеротандемным бициклическим пептидным комплексам, которые содержат первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на иммунной клетке, конъюгированный через линкер со вторым пептидным лигандом, который связывается с компонентом, присутствующим на раковой клетке. Изобретение также относится к применению указанных гетеротандемных бициклических пептидных комплексов для профилактики, подавления или лечения рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Циклические пептиды способны с высокой аффинностью и специфичностью к мишени связываться с белками-мишенями и, поэтому, представляют собой перспективный класс молекул для разработки терапевтических средств. Фактически, несколько циклических пептидов уже успешно используются в клинической практике, например антибактериальный пептид ванкомицин, иммунодепрессант циклоспорин или противораковый препарат октреотид (Driggers et al. (2008), *Nat Rev Drug Discov* 7 (7), 608-24). Хорошие связывающие свойства являются результатом относительно большой поверхности взаимодействия, образующейся между пептидом и мишенью, а также пониженной конформационной гибкости циклических структур. Обычно макроциклы связываются с поверхностями площадью несколько сотен квадратных ангстрем, как, например, циклический пептидный антагонист CXCR4-CVX15 (400 Å²; Wu et al. (2007), *Science* 330, 1066-71), циклический пептид с мотивом Arg-Gly-Asp, связывающийся с интегрином αVβ3 (355 Å²) (Xiong et al. (2002), *Science* 296 (5565), 151-5), или циклический пептидный ингибитор упаин-1, связывающийся с активатором плазминогена урокиназного типа (603 Å²; Zhao et al. (2007), *J Struct Biol* 160 (1), 1-10).

Из-за своей циклической конфигурации пептидные макроциклы являются менее гибкими, чем линейные пептиды, что приводит к меньшей потере энтропии при связывании с мишенями и приводит к более высокой аффинности связывания. Сниженная гибкость также приводит к блокировке мишень-специфичных конформаций, повышая специфичность связывания по сравнению с линейными пептидами. Этот эффект был продемонстрирован на мощном и селективном ингибиторе матриксной металлопротеиназы-8 (ММП-8), который терял свою селективность относительно других ММП при раскрытии его кольца (Cherney et al. (1998), *J Med Chem* 41 (11), 1749 -51). Усиление связывающих свойств, достигаемое за счет макроциклизации, даже более выражено у полициклических пептидов, имеющих более одного пептидного кольца, как, например, у ванкомицина, низина и актиномицина.

Различные исследовательские группы ранее осуществляли связывание полипептидов с остатками цистеина с синтетической молекулярной структурой (Kemp and McNamara (1985), *J. Org. Chem*; Timmerman et al. (2005), *ChemBioChem*). Meloen с

соавторами использовали трис(бромметил)бензол и родственные молекулы для быстрой и количественной циклизации множества пептидных петель на синтетических каркасах для структурной имитации поверхности белков (Timmerman et al. (2005), ChemBioChem). Способы получения лекарственных соединений-кандидатов, где указанные соединения получают путем связывания цистеинсодержащих полипептидов с молекулярным каркасом, таким как, например, трис(бромметил)бензол, раскрыты в WO 2004/077062 и WO 2006/078161.

Для создания и скрининга больших библиотек бициклических пептидов на связывание с представляющими интерес мишенями были разработаны комбинаторные подходы на основе фагового дисплея (Heinis et al. (2009), Nat Chem Biol 5 (7), 502-7 и WO 2009/098450). Кратко, комбинаторные библиотеки линейных пептидов, содержащих три остатка цистеина и две области из шести случайных аминокислот (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys), представлялись на фаге и подвергались циклизации путем ковалентного связывания боковых цепей цистеина с низкомолекулярным соединением трис(бромметил)бензолом.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту изобретения предложен комплекс гетеротандемных бициклических пептидов, содержащий:

(а) первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом иммунной клетки; конъюгированный через линкер с

(б) вторым пептидным лигандом, который связывается с компонентом раковой клетки; где каждый из указанных пептидных лигандов включает полипептид, содержащий по крайней мере три остатка цистеина, разделенных по меньшей мере двумя последовательностями петель, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с цистеиновыми остатками полипептида, так что на молекулярном каркасе образуются по меньшей мере две полипептидные петли.

Согласно дополнительному аспекту изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая гетеротандемный бициклический пептидный комплекс согласно настоящему документу в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложен комплекс гетеротандемных бициклических пептидов согласно настоящему документу для применения в профилактике, подавлении или лечении рака.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: схематическое изображение гетеротандемного бициклического пептидного комплекса, содержащего пептидный лиганд EphA2 и CD137, связывающийся как с иммунной клеткой, так и с раковой клеткой.

Фигура 2: структура и композиция EphA2-CD137 гетеротандемного бициклического пептидного комплекса, BCY7985.

Фигура 3: анализ EphA2-CD137 гетеротандемного бициклического пептидного комплекса, BCY7985, в люциферазном репортерном анализе на CD137 от Promega

(CS196008) в присутствии клеток HT1080, экспрессирующих EphA2.

Фигура 4: гетеротандемы EphA2/CD137 активны в репортерном анализе на CD137, и кратность индукции активации зависит от уровня экспрессии опухолевой мишени на клеточной линии, используемой в совместном культивировании.

Фигура 5: гетеротандемы EphA2/CD137 индуцируют уничтожение опухолевых клеток в анализе, основанном на совместном культивировании первичных Т-клеток человека и раковых клеток. Уничтожение опухолевых клеток оценивают путем подсчета жизнеспособных NucLight Red-положительных опухолевых клеток с течением времени. Окрашивание каспаз-3/7 используется для идентификации апоптотических опухолевых клеток.

Фигура 6: гетеротандемы нектин-4/CD137 активны в репортерном анализе на CD137, и кратность индукции активации зависит от уровня экспрессии опухолевой мишени в клеточной линии (HT1376: высокая экспрессия нектин-4, и NCI-H292: средняя экспрессия нектин-4), используемой в совместном культивировании.

Фигура 7: гетеротандемы нектин-4/CD137 индуцируют секрецию цитокинов IL-2 и IFN- γ в анализе, основанном на совместном культивировании с PBMC-4T1. BCY9350 и BCY9351 представляют собой несвязывающие контроли для нектин-4 и CD137, соответственно.

Фигура 8: гетеротандемы нектин-4/CD137 индуцируют зависимое от мишени высвобождение цитокинов в *ex vivo* культурах клеток первичных опухолей легких, полученных от пациента. (A) *Ex vivo* опухолевые клетки, полученные от пациента, образуют трехмерные сфероиды в течение 4 часов в культуре, 10-кратное изображение под световым микроскопом. (B) Проточный анализ экспрессии нектин-4 в полученных от пациентов образцах опухолей от 3 доноров. (C) Таблица показывает % CD137⁺ Т-клеток и нектин-4⁺ клеток в образцах от 3 доноров. (D) Тепловая карта, показывающая % изменения иммунных маркеров (нормализованных по носителю) в ответ на обработку контрольными/тестируемыми соединениями. (E) % CD8⁺ki67⁺ Т-клеток в ответ на обработку контрольными/тестируемыми соединениями (носитель обозначен пунктирной линией).

Фигура 9: гетеротандемы PD-L1/CD137 активны в репортерном анализе на CD137 в присутствии клеточной линии RKO, экспрессирующей PD-L1.

Фигура 10: фармакокинетика гетеротандемов у крыс SD: BCY10572 и BCY10000 вводили внутривенно в дозе 2 мг/кг (n=3).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту изобретения предложен гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, содержащий:

(a) первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом иммунной клетки; конъюгированный через линкер с

(b) вторым пептидным лигандом, который связывается с компонентом раковой клетки; где каждый из указанных пептидных лигандов включает полипептид, содержащий

по меньшей мере три остатка цистеина, разделенных по меньшей мере двумя последовательностями петель, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с цистеиновыми остатками полипептида, так что на молекулярном каркасе образуются по меньшей мере две полипептидные петли.

Первые пептидные лиганды

Ссылки в данном документе на термин «иммунная клетка» включают любую клетку в иммунной системе. Подходящие примеры включают лейкоциты, такие как лимфоциты (например, Т-лимфоциты или Т-клетки, В-клетки или естественные клетки-киллеры). В одном варианте осуществления Т-клетка представляет собой экспрессирующую CD8 или CD4 клетку. В другом варианте осуществления Т-клетка представляет собой экспрессирующую CD8 клетку. Другие примеры иммунных клеток включают дендритные клетки, фолликулярные дендритные клетки и гранулоциты.

В одном варианте осуществления компонент, присутствующий на иммунной клетке, представляет собой CD137.

CD137 является представителем семейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNF). Его альтернативные названия - представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 9 (TNFRSF9), 4-1BB и белок, индуцированный активацией лимфоцитов (ILA). CD137 может экспрессироваться активированными Т-клетками, но в большей степени на CD8⁺, чем на CD4⁺, Т-клетках. Кроме того, экспрессия CD137 обнаруживается на дендритных клетках, фолликулярных дендритных клетках, естественных клетках-киллерах, гранулоцитах и клетках стенок кровеносных сосудов в местах воспаления. Одной из характеристик активности CD137 является его костимулирующая активность в отношении активированных Т-клеток. Сшивание CD137 усиливает пролиферацию Т-клеток, секрецию IL-2, выживаемость и цитолитическую активность. Кроме того, он может повысить иммунную активность для уничтожения опухолей у мышей.

CD137 является костимулирующим рецептором Т-клеток, индуцируемым активацией TCR (Nam et al., *Curr. Cancer Drug Targets*, 5:357-363 (2005); Waits et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 23:23-68 (2005)). В дополнение к его экспрессии на активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, CD137 также экспрессируется на CD4⁺ CD25⁺ регуляторных Т-клетках, естественных киллерах (NK) и NK-Т-клетках, моноцитах, нейтрофилах и дендритных клетках. Его природный лиганд, CD137L, был описан на антигенпрезентирующих клетках, включая В-клетки, моноциты/макрофаги и дендритные клетки (Watts et al. *Annu. Rev. Immunol*, 23:23-68 (2005)). При взаимодействии со своим лигандом CD137 приводит к повышенной TCR-индуцированной пролиферации Т-клеток, продукции цитокинов, функциональному созреванию и увеличению выживаемости CD8⁺ Т-клеток (Nam et al, *Curr. Cancer Drug Targets*, 5:357-363 (2005), Watts et al., *Annu. Rev. Immunol*, 23:23-68 (2005)).

CD137-сигнальный путь, активируемый либо CD137L, либо с использованием агонистических моноклональных антител (mAb) против CD137 приводит к усилению TCR-индуцированной пролиферации Т-клеток, продукции цитокинов и функциональному

созреванию, а также к увеличению выживаемости CD8⁺ Т-клеток. Эти эффекты являются результатом: (1) активации сигнальных путей NF-κB, c-Jun NH2-концевой киназы/стресс-активируемой протеинкиназы (JNK/SAPK) и митоген-активируемой протеинкиназы p38 (MAPK); и (2) регуляции антиапоптотической экспрессии и экспрессии генов, связанных с клеточным циклом.

Эксперименты, проведенные на мышах с дефицитом CD137 и CD137L, дополнительно продемонстрировали важность костимуляции CD137 для формирования полностью компетентного Т-клеточного ответа.

НК-клетки, активируемые IL-2 и IL-15, экспрессируют CD137, и лигирование CD137 агонистическими mAb стимулирует пролиферацию НК-клеток и секрецию IFN-γ, но не их цитолитическую активность.

Кроме того, стимулированные CD137 НК-клетки способствуют размножению активированных Т-клеток *in vitro*.

В соответствии с их костимулирующей функцией, агонистические mAb против CD137, как было показано, способствуют отторжению сердечных и кожных аллотрансплантатов, уничтожают сформировавшиеся опухоли, увеличивают первичные противовирусные ответы CD8⁺ Т-клеток и повышают цитолитический потенциал Т-клеток. Эти исследования подтверждают мнение о том, что сигнальный путь CD137 способствует функционированию Т-клеток, что может повысить иммунитет против опухолей и инфекции.

В одном варианте осуществления первый пептидный лиганд включает связывающий CD137 бициклический пептидный лиганд.

Подходящие примеры связывающих CD137 бициклических пептидных лигандов раскрыты в патентных заявках Великобритании №№ 1712589.9 и 1802934.8, пептиды из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления изобретения связывающий CD137 бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность:

C_iIIEGQYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 1);

C_i[tBuAla]PE[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 3);

C_iIIEGQYC_{ii}F[D-Ala]DPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 4);

C_i[tBuAla]PK[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 5);

C_i[tBuAla]PE[D-Lys]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 6);

C_i[tBuAla]P[K(PYA)][D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 7);

C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 8);

C_iIEE[D-Lys(PYA)]QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 9); и

[dC_i][dI][dE][dE][K(PYA)][dQ][dY][dC_{ii}][dF][dA][dD][dP][dY][dNle][dC_{iii}] (SEQ ID NO: 10);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, Nle представляет собой норлейцин, tBuAla представляет собой трет-бутилаланин, PYA представляет собой 4-пентиновую кислоту, или их фармацевтически

приемлемую соль.

В одном конкретном варианте осуществления, который можно указать, связывающий CD137 бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность:

C_i IEEGQYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 1);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, Nle представляет собой норлейцин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления связывающий CD137 бициклический пептидный лиганд содержит N- и C-концевые модификации и включает:

Ac-A-(SEQ ID NO: 1)-Dap (далее обозначается как BCY7732);

Ac-A-(SEQ ID NO: 1)-Dap(PYA) (далее обозначается как BCY7741);

Ac-(SEQ ID NO: 3)-Dap (далее обозначается как BCY9172);

Ac-(SEQ ID NO: 3)-Dap(PYA) (далее обозначается как BCY11014);

Ac-A-(SEQ ID NO: 4)-Dap (далее обозначается как BCY8045);

Ac-(SEQ ID NO: 5)-A (далее обозначается как BCY8919);

Ac-(SEQ ID NO: 6)-A (далее обозначается как BCY8920);

Ac-(SEQ ID NO: 7)-A (далее обозначается как BCY8927);

Ac-(SEQ ID NO: 8)-A (далее обозначается как BCY8928);

Ac-A-(SEQ ID NO: 9)-A (далее обозначается как BCY7744); и

Ac-[dA]-(SEQ ID NO: 10)-[dA]-NH₂ (далее обозначается как BCY11506);

где Ac представляет собой ацетильную группу, Dap представляет собой диаминопропионовую кислоту, и PYA представляет собой 4-пентиновую кислоту, или их фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления, который можно указать, связывающий CD137 бициклический пептидный лиганд содержит N- и C-концевые модификации и включает:

Ac-A-(SEQ ID NO: 1)-Dap (далее обозначается как BCY7732);

где Ac представляет собой ацетильную группу, а Dap представляет собой диаминопропионовую кислоту, или их фармацевтически приемлемую соль.

Вторые пептидные лиганды

Ссылки в данном документе на термин «раковая клетка» включают любую клетку, которая, как известно, относится к раковым. Раковые клетки образуются при повреждении генов, отвечающих за регуляцию деления клеток. Канцерогенез вызывается мутацией и эпимутацией генетического материала нормальных клеток, что нарушает нормальный баланс между пролиферацией и гибелью клеток. Это приводит к неконтролируемому делению клеток и эволюции этих клеток путем естественного отбора в организме. Неконтролируемое и часто быстрое разрастание клеток может привести к доброкачественным или злокачественным опухолям (раку). Доброкачественные опухоли не распространяются на другие части тела и не проникают в другие ткани.

Злокачественные опухоли могут поражать другие органы, распространяться в отдаленные места (метастазы) и становиться опасными для жизни.

В одном варианте осуществления изобретения злокачественную клетку выбирают из опухолевой клетки HT1080, SC-OV-3, PC3, H1376, NCI-H292, LnCap, MC38, 4T1-D02 и RKO.

В одном варианте осуществления изобретения компонент, присутствующий на раковой клетке, представляет собой EphA2.

Рецепторные тирозинкиназы Eph принадлежат к большой группе рецепторных тирозинкиназ (RTK), киназ, которые фосфорилируют белки по остаткам тирозина. Eph и связанные с ними мембранные эффиновые лиганды (эффины) контролируют положение клеток и организацию ткани (Poliakov et al. (2004) *Dev Cell* 7, 465-80). Функциональные и биохимические ответы Eph возникают при более высоких состояниях олигомеризации лигандов (Stein et al. (1998) *Genes Dev* 12, 667-678).

Помимо других функций формирования паттерна клеток, различные Eph и эффины, как было показано, играют роль в развитии сосудов. Нокаут EphB4 и эффина-B2 приводит к отсутствию способности ремоделировать капиллярные русла в кровеносные сосуды (Poliakov et al., *supra*) и к гибели эмбрионов. Устойчивая экспрессия некоторых Eph-рецепторов и эффинов также наблюдалась в новообразованных взрослых микрососудах (Brantley-Sieders et al. (2004) *Curr Pharm Des* 10, 3431-42; Adams (2003) *J Anat* 202, 105-12).

Разрегулированное повторное появление некоторых эффинов и их рецепторов у взрослых также способствует инвазии опухоли, метастазированию и неоангиогенезу ((Nakamoto et al. (2002) *Microsc Res Tech* 59, 58-67; Brantley-Sieders et al., *supra*). Кроме того, было обнаружено, что некоторые члены семейства Eph сверхэкспрессируются на опухолевых клетках из различных опухолей человека (Brantley-Sieders et al., *supra*) Marme (2002) *Ann Hematol* 81 Suppl 2, S66; Booth et al. (2002) *Nat Med* 8, 1360-1).

ЕРН-рецептор А2 (рецептор-2 эффина А-типа) представляет собой белок, который у человека кодируется геном ЕРНА2.

EphA2 активируется при множественных раковых заболеваниях у человека, часто коррелируя с прогрессированием заболевания, метастазами и плохим прогнозом, например: при раке молочных желез (Zelinski et al (2001) *Cancer Res.* 61, 2301-2306; Zhuang et al (2010) *Cancer Res.* 70, 299-308; Brantley-Sieders et al (2011) *PLoS One* 6, e24426), легких (Brannan et al (2009) *Cancer Prev Res (Phila)* 2, 1039-1049; Kinch et al (2003) *Clin Cancer Res.* 9, 613-618; Guo et al (2013) *J Thorac Oncol.* 8, 301-308, желудка (Nakamura et al (2005) *Cancer Sci.* 96, 42-47; Yuan et al (2009) *Dig Dis Sci* 54, 2410-2417, поджелудочной железы (Mudali et al (2006) *Clin Exp Metastasis* 23, 357-365), простаты (Walker-Daniels et al (1999) *Prostate* 41, 275-280), печени (Yang et al (2009) *Hepatol Res.* 39, 1169-1177) и глиобластоме (Wykosky et al (2005) *Mol Cancer Res.* 3, 541-551; Li et al (2010) *Tumor Biol.* 31, 477-488).

Полностью роль EphA2 в прогрессировании рака до сих пор не установлена, хотя есть доказательства взаимодействия на многих стадиях развития рака, включая рост

опухолевых клеток, выживаемость, инвазию и ангиогенез. Подавление экспрессии EphA2 подавляет распространение раковых клеток опухоли (Binda et al (2012) *Cancer Cell* 22, 765-780), тогда как блокада EphA2 ингибирует индуцированную VEGF миграцию клеток (Hess et al (2001) *Cancer Res.* 61, 3250-3255), прорастание и ангиогенез (Cheng et al (2002) *Mol Cancer Res.* 1, 2-11; Lin et al (2007) *Cancer* 109, 332-40) и прогресс метастазирования (Brantley-Sieders et al (2005) *FASEB J.* 19, 1884-1886).

Было показано, что конъюгат антитела и лекарственного средства к EphA2 значительно снижает рост опухоли на крысиных и мышиных моделях ксенотрансплантатов (Jackson et al (2008) *Cancer Research* 68, 9367-9374), и аналогичный подход был опробован на человеке, хотя лечение вынуждено было прекращено из-за побочных эффектов, связанных с лечением (Annunziata et al (2013) *Invest New drugs* 31, 77-84).

В одном варианте осуществления изобретения второй пептидный лиганд включает бициклический пептидный лиганд, связывающийся с EphA2.

Подходящие примеры связывающихся EphA2 бициклических пептидных лигандов раскрыты в патентных заявках Великобритании №№ 1721259.8 и 1804102.0, пептиды из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления изобретения связывающийся с EphA2 бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность:

C_i [HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 2); и

C_i LWDPTPC_{ii}ANLHL[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 11);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, HyP представляет собой гидроксипролин, dD представляет собой аспарагиновую кислоту в D-конфигурации, и HArg представляет собой гомоаргинин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте осуществления изобретения, который можно указать, связывающийся EphA2 бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность:

C_i [HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 2);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, HyP представляет собой гидроксипролин, dD представляет собой аспарагиновую кислоту в D-конфигурации, и HArg представляет собой гомоаргинин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления изобретения связывающийся EphA2 бициклический пептидный лиганд содержит N-концевые модификации и включает:

A-HArg-D-(SEQ ID NO: 2) (далее обозначается как BCY9594);

[B-Ala]-[Sar₁₀]-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 2) (далее обозначается как BCY6099);

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 2) (далее обозначается как BCY6169); и

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-VGP-(SEQ ID NO: 11) (далее обозначается как BCY8941);

где HArg представляет собой гомоаргинин, PУA представляет собой 4-пентиновую кислоту, Sar₁₀ представляет собой 10 саркозиновых звеньев, B-Ala представляет собой бета-аланин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления изобретения, который можно указать, связывающий EphA2 бициклический пептидный лиганд содержит N-концевые модификации и включает:

A-HArg-D-(SEQ ID NO: 2) (далее обозначается как BCY9594).

где HArg представляет собой гомоаргинин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В альтернативном варианте осуществления изобретения компонент, присутствующий на раковой клетке, представляет собой PD-L1.

Лиганд-1 белка запрограммированной гибели клеток-1 (PD-L1) представляет собой 290-аминокислотный трансмембранный белок I типа, кодируемый геном CD274 на хромосоме 19 мыши и хромосоме 9 человека. PD-L1 задействован в избегании от иммунного ответа, связанного с хронической инфекцией, например, хронической вирусной инфекцией (включая, среди прочего, HIV, HBV, HCV и HTLV), хронической бактериальной инфекцией (включая, например, среди прочего, *Helicobacter pylori*) и хронической паразитарной инфекцией (включая, например, *Schistosoma mansoni*). Экспрессия PD-L1 была обнаружена в ряде тканей и типов клеток, включая Т-клетки, В-клетки, макрофаги, дендритные клетки и негематопозитические клетки, включая эндотелиальные клетки, гепатоциты, мышечные клетки и плаценту.

PD-L1 также участвует в подавлении противоопухолевой иммунной активности. Опухоли экспрессируют антигены, которые могут распознаваться Т-клетками хозяина, но иммунологический клиренс опухолей случается редко. Частично это происходит из-за подавления иммунитета микросредой опухоли. Экспрессия PD-L1 на многих опухолях является компонентом этой подавляющей среды и действует совместно с другими иммунодепрессивными сигналами. Экспрессия PD-L1 была продемонстрирована *in situ* на большом количестве солидных опухолей, включая молочную железу, легкие, толстую кишку, яичники, меланому, мочевой пузырь, печень, слюну, желудок, глиомы, щитовидную железу, эпителий тимуса, голову и шею (Brown JA et al. 2003 *Immunol.* 170:1257-66; Dong H et al. 2002 *Nat. Med.* 8:793-800; Hatanishi J, et al. 2007 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:3360-65; Strome SE et al. 2003 *Cancer Res.* 63:6501-5; Inman BA et al. 2007 *Cancer* 109:1499-505; Konishi J et al. 2004 *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100; Nakanishi J et al. 2007 *Cancer Immunol. Immunother.* 56:1173-82; Nomi T et al. 2007 *Clin. Cancer Res.* 13:2151-57; Thompson RH et al. 2004 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 17174-79; Wu C et al. 2006 *Acta Histochem.* 108:19-24). Кроме того, экспрессия рецептора PD-L1, белка запрограммированной гибели клеток-1 (также известного как PD-1 и CD279) повышается в лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, и это также способствует иммуносупрессии в опухоли (Blank C et al. 2003 *Immunol.* 171: 4574-81). Что наиболее важно, исследования, связывающие экспрессию PD-L1 в опухолях с исходом заболевания, показывают, что

экспрессия PD-L1 сильно коррелирует с неблагоприятным прогнозом при раке почек, яичников, мочевого пузыря, молочных желез, желудка и поджелудочной железы (Hamanishi J et al. 2007 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:3360-65; Inman BA et al. 2007 Cancer 109:1499-505; Konishi J et al. 2004 Clin. Cancer Res. 10:5094-100; Nakanishi J et al. 2007 Cancer Immunol. Immunother. 56:1173-82; Nomi T et al. 2007 Clin. Cancer Res. 13:2151-57; Thompson RH et al. 2004 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:17174-79; Wu C et al. 2006 Acta Histochem. 108:19-24). Кроме того, эти исследования показывают, что более высокие уровни экспрессии PD-L1 в опухолях могут способствовать продвижению стадии опухоли и инвазии в более глубокие тканевые структуры.

Сигнальный путь PD-1 также может играть роль в гематологических злокачественных новообразованиях. PD-L1 экспрессируется на клетках множественной миеломы, но не на нормальных плазматических клетках (Liu J et al. 2007 Blood 110: 296-304). PD-L1 экспрессируется на некоторых первичных Т-клеточных лимфомах, особенно на анапластических крупноклеточных Т-лимфомах (Brown JA et al. 2003 Immunol. 170: 1257-66). PD-1 экспрессируется на высоком уровне на Т-клетках ангиоиммунобластных лимфом, а PD-L1 экспрессируется на ассоциированной сети фолликулярных дендритных клеток (Dorfman DM et al. 2006 Am. J. Surg. Pathol. 30: 802-10). В лимфоме Ходжкина с преобладанием узловых лимфоцитов Т-клетки, связанные с лимфоцитарными или гистиоцитарными (L&H) клетками, экспрессируют PD-1. Микроматричный анализ на экспрессию генов, индуцированных лигированием PD-1, предполагает, что ассоциированные с опухолью Т-клетки отвечают на сигналы PD-1 *in situ* при лимфоме Ходжкина (Chemnitz JM et al. 2007 Blood 110: 3226-33). PD-1 и PD-L1 экспрессируются на CD4 Т-клетках при HTLV-1-опосредованном Т-клеточном лейкозе и лимфоме у взрослых (Shimauchi T et al. 2007 Int. J. Cancer 121: 2585-90). Эти опухолевые клетки имеют сниженный ответ на сигналы от TCR.

Исследования на животных моделях демонстрируют, что PD-L1 на опухолях ингибирует активацию Т-клеток и лизис опухолевых клеток и в некоторых случаях приводит к повышенной опухолеспецифической гибели Т-клеток (Dong H et al. 2002 Nat. Med. 8:793-800; Hirano F et al. 2005 Cancer Res. 65:1089-96). APC (антигенпредставляющие клетки), ассоциированные с опухолью, также могут использовать путь PD-1:PD-L1 для контроля противоопухолевых Т-клеточных ответов. Экспрессия PD-L1 в популяции ассоциированных с опухолью миелоидных DC (дендритных клеток) активируется факторами из среды, окружающей опухоль (Curiel TJ et al. 2003 Nat. Med. 9:562-67). Плазмацитоидные DC в дренирующей опухоли лимфатическом узле меланомы B16 экспрессируют IDO, которая сильно активирует супрессорную активность регуляторных Т-клеток. Супрессорная активность регуляторных Т-клеток, обусловленная воздействием IDO, требовала контакта клеток с IDO-экспрессирующими DC (Sharma MD et al. 2007 Clin. Invest. 117:2570-82).

В одном варианте осуществления второй пептидный лиганд включает связывающий PD-L1 бициклический пептидный лиганд.

Подходящие примеры связывающих PD-L1 бициклических пептидных лигандов раскрыты в патентных заявках Великобритании №№ 1820956.9 и 1820969.2, пептиды из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления изобретения связывающий PD-L1 бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

C_i [HArg]DWC_{ii}HWTFSHGHPC_{iii} (SEQ ID NO: 12);

C_i SAGWLTMC_{ii}QKLHLC_{iii} (SEQ ID NO: 13); и

C_i SAGWLTMC_{ii}Q[K(PYA)]LHLC_{iii} (SEQ ID NO: 14);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, HArg представляет собой гомоаргинин, и PYA представляет собой 4-пентиновую кислоту, или их фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления изобретения связывающий PD-L1 бициклический пептидный лиганд содержит N-концевые и/или C-концевые модификации и включает:

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]- (SEQ ID NO: 12) (далее обозначается как BCY8938);

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-SDK- (SEQ ID NO: 13) (далее обозначается как BCY10043);

NH₂-SDK- (SEQ ID NO: 13)-[Sar₁₀]-[K(PYA)] (далее обозначается как BCY10044);

NH₂-SDK- (SEQ ID NO: 14) (далее обозначается как BCY10045); и

Ac-SDK- (SEQ ID NO: 14)-PSH (далее обозначается как BCY10861);

где PYA представляет собой 4-пентиновую кислоту, B-Ala представляет собой бета-аланин, Sar₁₀ представляет собой 10 саркозиновых звеньев, или их фармацевтически приемлемую соль.

В альтернативном варианте осуществления изобретения компонент, присутствующий на раковой клетке, представляет собой нектин-4.

Нектин-4 является поверхностной молекулой, которая принадлежит к семейству белков нектинов, которое состоит из 4 членов. Нектины являются молекулами клеточной адгезии, которые играют ключевую роль в различных биологических процессах, таких как поляриность, пролиферация, дифференцировка и миграция, для эпителиальных, эндотелиальных, иммунных и нейрональных клеток во время развития и взрослой жизни биологических особей. Они участвуют в нескольких патологических процессах у человека. Нектины являются основными рецепторами полиовируса, вируса простого герпеса и вируса кори. Мутации в генах, кодирующих нектин-1 (PVRL1) или нектин-4 (PVRL4), вызывают синдромы эктодермальной дисплазии, связанные с другими аномалиями. Нектин-4 экспрессируется во время внутриутробного развития. Во взрослых тканях его экспрессия более ограничена, чем других представителей семейства. Нектин-4 представляет собой опухоль-ассоциированный антиген в 50%, 49% и 86% случаях карциномы молочных желез, яичников и легких, соответственно, в основном на опухолях с плохим прогнозом. Его экспрессия не обнаруживается в соответствующих нормальных тканях. В опухолях молочной железы нектин-4 экспрессируется в основном в трижды негативных карциномах и карциномах ERBB2+. В сыворотке крови пациентов с этими

видами рака обнаружение растворимых форм нектин-4 связано с плохим прогнозом. Уровни нектин-4 в сыворотке крови повышаются при прогрессировании метастазирования и снижаются после лечения. Эти результаты предполагают, что нектин-4 может являться хорошей мишенью для лечения рака. Соответственно, в прототипах было описано несколько антител против нектин-4. В частности, энфортумаб-ведотин (ASG-22ME) представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), нацеленный на нектин-4, и в настоящее время он проходит клинические испытания для лечения пациентов с солидными опухолями.

В одном варианте осуществления изобретения второй пептидный лиганд содержит связывающий нектин-4 бициклический пептидный лиганд.

Подходящие примеры связывающих нектин-4 бициклических пептидных лигандов раскрыты в патентных заявках Великобритании №№ 1810250.9, 1815684.4 и 1818499.4, пептиды из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления изобретения связывающий нектин-4 бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

$C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 15; далее обозначается как BCY8116);

$C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HAArg]D[dW]STP[HyP][dW]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 16; далее обозначается как BCY11415); и

$C_iP[1Nal][dK](Sar_{10}-(B-Ala))C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 17);

$C_iPFGC_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 18; далее обозначается как BCY11414);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, 1Nal представляет собой 1-нафтилаланин, HAArg представляет собой гомоаргинин, HyP представляет собой гидроксипролин, B-Ala представляет собой бета-аланин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления изобретения связывающий нектин-4 бициклический пептидный лиганд необязательно содержит N-концевые модификации и включает:

SEQ ID NO: 15 (далее обозначается как BCY8116);

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]- (SEQ ID NO: 15) (далее обозначается как BCY8846);

SEQ ID NO: 16 (далее обозначается как BCY11415);

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]- (SEQ ID NO: 16) (далее обозначается как BCY11942);

Ac- (SEQ ID NO: 17) (далее обозначается как BCY8831); и

SEQ ID NO: 18 (далее обозначается как BCY11414);

где PYA представляет собой 4-пентиновую кислоту, B-Ala представляет собой бета-аланин, Sar₁₀ представляет собой 10 саркозиновых звеньев, или их фармацевтически приемлемую соль.

В альтернативном варианте осуществления изобретения компонент,

присутствующий на раковой клетке, представляет собой простатоспецифический мембранный антиген (PSMA).

Простатоспецифический мембранный антиген (PSMA) (также известный как глутаматкарбоксипептидаза II (GCP II), N-ацетил-L-аспартил-L-глутаматпептидаза I (NAALADase I) и пептидаза NAAG) представляет собой фермент, который у человека кодируется геном FOLH1 (фолатгидролазой 1). GCP II человека содержит 750 аминокислот и имеет молекулярный вес приблизительно 84 кДа.

PSMA у человека на высоком уровне экспрессируется в простате, примерно в сто раз выше, чем в большинстве других тканей. При некоторых формах рака предстательной железы PSMA является вторым по повышению уровня генным продуктом с превышением в 8-12 раз по сравнению с уровнем в доброкачественных клетках простаты. Из-за этой высокой экспрессии PSMA принят в разработку в качестве потенциального биомаркера для терапии и визуализации некоторых видов рака. При раке простаты человека более высокая экспрессия PSMA в опухоли связана с более быстрым прогрессированием и большим процентом пациентов, страдающих рецидивами.

В одном варианте осуществления изобретения второй пептидный лиганд включает связывающийся с PSMA бициклический пептидный лиганд.

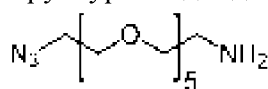
Подходящие примеры связывающих PSMA бициклических пептидных лигандов описаны в патентных заявках Великобритании №№ 1810318.4, 1810325.9 и 1820325.7, пептиды из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Линкеры

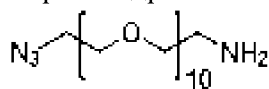
Следует понимать, что первый пептидный лиганд может быть конъюгирован со вторым пептидным лигандом через любой подходящий линкер. Обычно конструкция указанного линкера будет такой, что два бициклических пептида представлены таким образом, что они могут связываться беспрепятственно со своими соответствующими мишенями либо по отдельности, либо при одновременном связывании с обоими рецепторами-мишенями. Кроме того, линкер должен позволять связываться с обоими мишенями одновременно, сохраняя при этом соответствующее расстояние между клетками-мишенями, которое может привести к желаемому функциональному результату. Свойства линкера можно модулировать для увеличения длины, жесткости или растворимости для оптимизации желаемого функционального результата. Линкер также может быть подобран таким образом, чтобы позволить присоединиться более чем одному бициклическому соединению к одной мишени. Повышение валентности любого связывающего пептида может способствовать увеличению сродства гетеротандема к клеткам-мишеням или может помочь индуцировать олигомеризацию одного или обоих рецепторов-мишеней.

В одном варианте осуществления изобретения линкер выбран из следующих последовательностей: $-CH_2-$, $-PEG_5-$, $-PEG_{10}-$, $-PEG_{12}-$, $-PEG_{23}-$, $-PEG_{24}-$, $-PEG_{15}-Sar_5-$, $-PEG_{10}-Sar_{10}-$, $-PEG_5-Sar_{15}-$, $-PEG_5-Sar_5-$, $-B-Ala-Sar_{20}-$, $-B-Ala-Sar_{10}-PEG_{10}-$, $-B-Ala-Sar_5-PEG_{15}-$ и $-B-Ala-Sar_5-PEG_5-$.

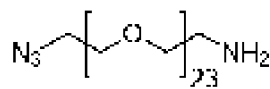
Структуры подходящих линкеров подробно описаны ниже:



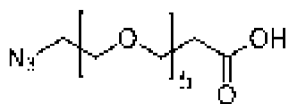
H2N-Peg5-N3
COM00000132



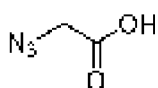
H2N-Peg10-N3
COM00000134



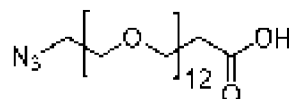
H2N-Peg23-N3
COM00000135



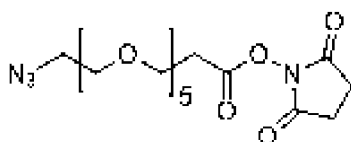
N3-PEG5-COOH
COM00000467



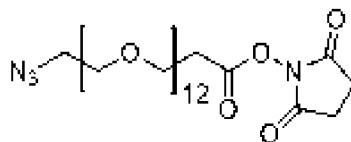
N3-CH2-COOH
COM00000468



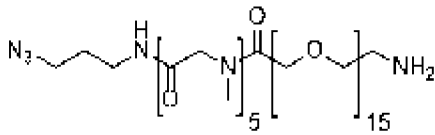
N3-PI-G12-COOH
COM00000466



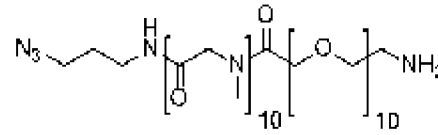
NHS-PEG5-N3



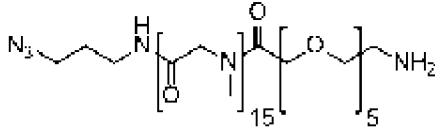
NHS-PEG12-N3



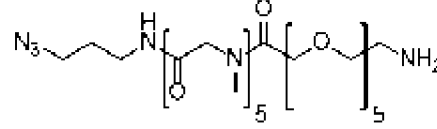
H2N-PEG15-SAR5-N3
COM00000128



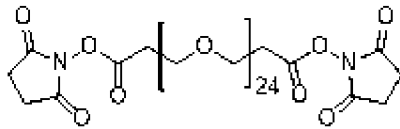
H2N-PEG10-SAR10-N3
COM00000129



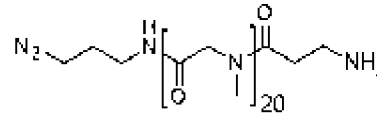
H2N-PEG5-SAR15-N3
COM00000130



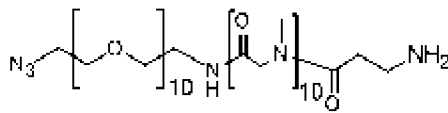
H2N-PEG5-SAR5-N3
COM00000131



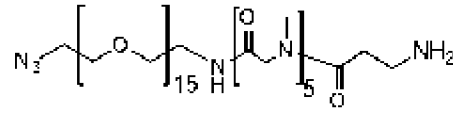
NHS-PEG24-NHS
COM00000469



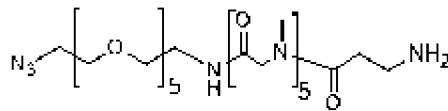
H2N-(B-Ala)-SAR20-N3
COM00000470



H2N-(B-Ala)-SAR10-PEG10-N3
COM00000471



H2N-(B-Ala)-SAR5-PEG15-N3
COM00000472



H2N-(B-Ala)-SAR5-PEG5-N3
COM00000473

Гетеротандемные комплексы

В одном конкретном варианте осуществления первый пептидный лиганд содержит связывающий CD137 бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу TATA, второй пептидный лиганд включает связывающий EphA2 бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу TATA, и указанный гетеротандемный комплекс выбирают из:

<i>№ комплекса</i>	<i>BCY номер для EphA2.</i>	<i>Точка присоединения</i>	<i>Линкер</i>	<i>BCY номер для CD137</i>	<i>Точка присоединения</i>
BCY9173	BCY6169	N-концевая PУA	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C-концевая Dар
BCY7985	BCY6169	N-концевая PУA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C-концевая Dар

BCY8942	BCY6169	N-концевая PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8045	C-концевая Dap
BCY8943	BCY8941	N-концевая PYA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C-концевая Dap
BCY9647	BCY6099	N-конец	-PEG ₁₀ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9648	BCY6099	N-конец	-PEG ₂₃ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9655	BCY6099	N-конец	-PEG ₁₅ - Sar ₅ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9656	BCY6099	N-конец	-PEG ₁₀ - Sar ₁₀ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9657	BCY6099	N-конец	-PEG ₅ - Sar ₁₅ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9658	BCY6099	N-конец	-PEG ₅ - Sar ₅ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9659	BCY6099	N-конец	-PEG ₅ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9758	BCY6099	N-конец	-PEG ₂₄ -	BCY7732	C-концевая Dap
BCY10568	BCY6169	N-концевая PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8919	Lys3
BCY10570	BCY6169	N-концевая PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8920	dLys4
BCY10574	BCY9594	N-конец	-PEG ₅ -	BCY8927	Lys (PYA)3
BCY10575	BCY9594	N-конец	-PEG ₅ -	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY10576	BCY9594	N-конец	-PEG ₅ -	BCY11014	C-концевая Dap(PYA)
BCY10577	BCY6169	N-конец	-CH ₂ -	BCY9172	C-концевая Dap

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY7985 состоит из CD137-специфичного пептида BCY7859, связанного с N-концевой PYA-группой EphA2-специфичного пептида BCY6169 через PEG12 (графически показан на фигуре 2).

CD137 представляет собой гомотримерный белок, а природный лиганд CD137L существует в виде гомотримера, который либо экспрессируется на иммунных клетках, либо секретируется. Биологическая активность CD137 сильно зависит от мультимеризации в отношении индукции активности CD137 в иммунных клетках. Одним из способов осуществления мультимеризации CD137 является клеточное перекрестное связывание специфичного агониста CD137 посредством взаимодействия со специфичным рецептором, присутствующим на другой клетке.

EphA2 на высоком уровне экспрессируется на опухолевых клетках, и олигомеризация этой рецепторной тирозинкиназы А-эфриновыми лигандами приводит к

ее активации. Не ограничиваясь какой-либо одной гипотезой, авторы изобретения полагают, что гетеротандем EphA2-CD137, состоящий из одного EphA2-специфичного пептида, связанного с одним CD137-специфичным пептидом, действует для перекрестного связывания CD137. Подразумевается, что CD137 будет мультимеризоваться и активироваться в присутствии EphA2 на клетках, таких как опухолевые клетки. Это будет приводить к активации CD137-иммунных клеток в локальной среде опухоли (фигура 1).

Эта гипотеза была проверена в репортерном анализе на клеточную активность CD137, описанном в настоящем документе, и результаты показаны в настоящем документе на фигуре 3, где можно увидеть, что BCY7985 продемонстрировал сильную индукцию активности CD137 в клетке в репортерном люциферазном анализе на CD137 от Promega (CS196008) в присутствии экспрессирующих EphA2 клеток HT1080.

В одном альтернативном конкретном варианте осуществления изобретения первый пептидный лиганд содержит связывающий CD137 бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, второй пептидный лиганд включает связывающий нектин-4 бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, и указанный гетеротандемный комплекс выбирают из:

<i>№ комплекса а</i>	<i>BCY номер для нектин-4</i>	<i>Точка присоединения</i>	<i>Линкер</i>	<i>BCY номер для CD137</i>	<i>Точка присоединения</i>
BCY8854	BCY8846	N-концевая PYA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C-концевая Dap
BCY9350	BCY11942	N-концевая PYA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C-концевая Dap
BCY9351	BCY8846	N-концевая PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8045	C-концевая Dap
BCY9399	BCY8116	N-конец	-PEG ₁₀ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9400	BCY8116	N-конец	-PEG ₂₃ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9401	BCY8116	N-конец	-B-Ala-Sar ₂₀ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9403	BCY8116	N-конец	-B-Ala-Sar ₁₀ -PEG ₁₀ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9405	BCY8116	N-конец	-B-Ala-Sar ₅ -PEG ₁₅ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9406	BCY8116	N-конец	-B-Ala-Sar ₅ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)

			PEG ₅ -		
BCY9407	BCY8116	N-конец	-PEG ₁₅ - Sar ₅ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9408	BCY8116	N-конец	-PEG ₁₀ - Sar ₁₀ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9409	BCY8116	N-конец	-PEG ₅ - Sar ₁₅ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9410	BCY8116	N-конец	-PEG ₅ - Sar ₅ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9411	BCY8116	N-конец	-PEG ₅ -	BCY7741	C-концевая Dap(PYA)
BCY9759	BCY8116	N-конец	-PEG ₂₄ -	BCY7732	C-концевая Dap
BCY1000 0	BCY8846	N-концевая PYA	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C-концевая Dap
BCY1056 7	BCY8846	N-концевая PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8919	Lys3
BCY1056 9	BCY8846	N-концевая PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8920	dLys4
BCY1057 1	BCY8116	N-конец	-PEG ₅ -	BCY8927	Lys(PYA)3
BCY1057 2	BCY8116	N-конец	-PEG ₅ -	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY1057 3	BCY8116	N-конец	-PEG ₅ -	BCY11014	C-концевая Dap(PYA)
BCY1057 8	BCY8846	N-концевая PYA	-CH ₂ -	BCY9172	C-концевая Dap
BCY1091 7	BCY8831	dLys(Sar ₁₀)-(B- Ala))4	-PEG ₁₂ -	BCY11014	C-концевая Dap(PYA)
BCY1102 0	BCY8831	dLys(Sar ₁₀)-(B- Ala))4	-PEG ₅ -	BCY11014	C-концевая Dap(PYA)
BCY1137 3	BCY8116	N-конец	-CH ₂ -	BCY8927	Lys(PYA)3
BCY1137 4	BCY8116	N-конец	-CH ₂ -	BCY8928	dLys (PYA)4

BCY1137 5	BCY8116	N-конец	-CH ₂ -	BCY11014	C-концевая Dap(PYA)
BCY1161 6	BCY8116	N-конец	-PEG ₅ -	BCY7744	dLys (PYA)4
BCY1161 7	BCY8116	N-конец	-PEG ₅ -	BCY11506	Lys(PYA)4
BCY1185 7	BCY11414	N-конец	-PEG ₅ -	BCY7744	dLys (PYA)4
BCY1185 8	BCY11414	N-конец	-PEG ₅ -	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY1185 9	BCY11415	N-конец	-PEG ₅ -	BCY8928	dLys (PYA)4

Не ограничиваясь какой-либо одной гипотезой, авторы изобретения полагают, что гетеротандем нектин-4-CD137, состоящий из одного нектин-4-специфичного пептида, связанного с одним CD137-специфичным пептидом, действует в отношении перекрестного связывания CD137 таким же образом, как описано выше для EphA2.

В одном варианте осуществления изобретения гетеротандем нектин-4-CD137 отличается от любого одного или нескольких из: BCY11857, BCY11858 и/или BCY11859.

В одном альтернативном конкретном варианте осуществления изобретения первый пептидный лиганд содержит связывающий CD137 бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, второй пептидный лиганд включает связывающий PD-L1 бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, и указанный гетеротандемный комплекс выбирают из:

<i>№ комплекса</i>	<i>BCY номер для PD-L1</i>	<i>Точка присоединения</i>	<i>Линкер</i>	<i>BCY номер для CD137</i>	<i>Точка присоединения</i>
BCY8939	BCY8938	N-концевая PYA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C-концевая Dap
BCY10580	BCY10043	N-концевая PYA	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C-концевая Dap
BCY10581	BCY10044	C-концевая Lys(PYA)	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C-концевая Dap
BCY10582	BCY10045	Lys(PYA)9	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C-концевая Dap
BCY11017	BCY10861	Lys(PYA)9	-PEG ₁₂ -	BCY8919	Lys3
BCY11018	BCY10861	Lys(PYA)9	-PEG ₁₂ -	BCY8920	dLys4
BCY11019	BCY10861	Lys(PYA)9	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C-концевая Dap
BCY11376	BCY10861	Lys(PYA)9	-CH ₂ -	BCY8919	Lys3

BCY11377	BCY10861	Lys(PYA)9	-CH ₂ -	BCY8920	dLys4
BCY11378	BCY10861	Lys(PYA)9	-CH ₂ -	BCY9172	C-концевая Dap
BCY11379	BCY10861	Lys(PYA)9	-PEG ₅ -	BCY8919	Lys3
BCY11380	BCY10861	Lys(PYA)9	-PEG ₅ -	BCY8920	dLys4
BCY11381	BCY10861	Lys(PYA)9	-PEG ₅ -	BCY9172	C-концевая Dap

Не ограничиваясь какой-либо одной гипотезой, авторы изобретения полагают, что гетеротандем PD-L1-CD137, состоящий из одного PD-L1-специфичного пептида, связанного с одним CD137-специфичным пептидом, действует в отношении перекрестного связывания CD137 таким же образом, как описано выше для EphA2.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистами в данной области, например в области химии пептидов, культуры клеток и фагового дисплея, химии нуклеиновых кислот и биохимии. Стандартные методы используются для молекулярной биологии, генетических и биохимических методов (см. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th ed., John Wiley & Sons, Inc.), которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Номенклатура

Нумерация

При указании положений аминокислотных остатков в соединениях по изобретению остатки цистеина (C_i, C_{ii} и C_{iii}) опускаются в нумерации, поскольку они являются инвариантными, поэтому нумерация аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 1 является такой, как показано ниже:

C_i-I₁-E₂-E₃-G₄-Q₅-Y₆-C_{ii}-F₇-A₈-D₉-P₁₀-Y₁₁-[Nle]₁₂-C_{iii} (SEQ ID NO: 1).

Для целей этого описания предполагается, что все бициклические пептиды циклизованы с использованием ТВМВ (1,3-трис(бромметил)бензола или 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-она (ТАТА) с образованием тризамещенной структуры. Циклизация с помощью ТВМВ и ТАТА происходит по C_i, C_{ii} и C_{iii}.

Молекулярный формат

N- или C-концевые удлинения основной последовательности бицикла добавляются к левой или правой стороне последовательности и отделяются дефисом. Например, N-концевой хвост βAla-Sar10-Ala а будет указываться как:

βAla-Sar10-A-(SEQ ID NO: X).

Инвертированные пептидные последовательности

В свете раскрытия в Nair et al (2003) *J Immunol* 170(3), 1362-13733 предполагается, что описанные в настоящем документе пептидные последовательности также найдут применение в их ретро-инвертированной форме. Например, последовательность является инвертированной (т.е. N-конец становится C-концом и наоборот), и ее стереохимия также является обращенной (т.е. D-аминокислоты становятся L-аминокислотами и наоборот).

Пептидные лиганды

Пептидный лиганд, указанный настоящем документе, относится к пептиду, ковалентно связанному с молекулярным каркасом. Обычно такие пептиды содержат две или более реакционноспособные группы (то есть остатки цистеина), которые способны образовывать ковалентные связи с каркасом, и последовательность между указанными реакционноспособными группами, которую называют последовательностью петли, поскольку она образует петлю, когда пептид связывается с каркасом. В данном случае пептиды содержат по меньшей мере три остатка цистеина (указываемых в настоящем документе как C_i, C_{ii} и C_{iii}) и образуют по меньшей мере две петли на каркасе.

Фармацевтически приемлемые соли

Следует понимать, что солевые формы входят в объем данного изобретения, и ссылки на пептидные лиганды включают солевые формы указанных лигандов.

Соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную составляющую, обычными химическими способами, такими как способы, описанные в *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, твердая обложка, 388 страниц, август 2002. Как правило, такие соли можно получить реакцией свободных кислотных или основных форм этих соединений с подходящим основанием или кислотой в воде или в органическом растворителе, или в их смеси.

Соли присоединения кислот (моно- или ди-соли) могут быть образованы с широким спектром кислот, как неорганических, так и органических. Примеры солей включают моно- или ди-соли, образованные с кислотой, выбранной из группы, состоящей из уксусной, 2,2-дихлоруксусной, адипиновой, альгиновой, аскорбиновой (например, L-аскорбиновой), L-аспарагиновой, бензолсульфоновой, бензойной, 4-ацетамидобензойной, бутановой, (+)-камфорной, камфорно-сульфоновой, (+)-(1S)-камфора-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламовой, додецилсерной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, муравьиной, fumarовой, галактарной, гентизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой), α -оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, гидрогалогеновых кислот (например, бромистоводородной, хлористоводородной, йодистоводородной), изетионовой, молочной (например, (+)-L-молочной, (\pm)-DL-молочной), лактобионовой, малеиновой, яблочной, (-)-L-яблочной, малоновой, (\pm)-DL-миндальной, метансульфоновой, нафталин-2-сульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, 1-гидрокси-2-нафтойной, никотиновой, азотной, олеиновой, оротовой, щавелевой, пальмитиновой, памоиновой, фосфорной, пропионовой, пировиноградной, L-пироглутаминовой, салициловой, 4-аминосалициловой, себациновой, стеариновой, янтарной, серной, дубильной, (+)-L-винной, тиоциановой, *n*-толуолсульфоновой, ундециленовой и валериановой кислот, а также ацилированных аминокислот и катионообменных смол.

Одна определенная группа солей состоит из солей, образованных из уксусной, соляной, йодистоводородной, фосфорной, азотной, серной, лимонной, молочной, янтарной, малеиновой, яблочной, изетионовой, фумаровой, бензолсульфоновой, толуолсульфоновой, серной, метансульфоновой (мезилат), этанселенсульфоновой, нафталинсульфоновой, валериановой, пропановой, бутановой, малоновой, глюкуроновой и лактобионовой кислот. Одна конкретная соль представляет собой гидрохлорид. Другой конкретной солью является ацетат.

Если соединение является анионным или имеет функциональную группу, которая может быть анионной (например, $-\text{COOH}$ может быть $-\text{COO}^-$), то соль может быть образована с органическим или неорганическим основанием, генерирующим подходящий катион. Примеры подходящих неорганических катионов включают, но не ограничиваются ими, ионы щелочных металлов, такие как Li^+ , Na^+ и K^+ , катионы щелочноземельных металлов, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+} , и другие катионы, такие как Al^{3+} или Zn^+ . Примеры подходящих органических катионов включают, но не ограничиваются ими, ион аммония (например, NH_4^+) и замещенные ионы аммония (например, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются те, которые получены из метиламина, этиламина, диэтиламина, пропиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтаноламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером обычного иона четвертичного аммония является $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Когда соединения по изобретению содержат аминогруппу, они могут образовывать четвертичные аммониевые соли, например, путем реакции с алкилирующим агентом в соответствии со способами, хорошо известными специалисту в данной области. Такие соединения четвертичного аммония входят в объем изобретения.

Модифицированные производные

Следует принимать во внимание, что модифицированные производные пептидных лигандов, описанные в данном документе, входят в объем настоящего изобретения. Примеры таких подходящих модифицированных производных включают одну или несколько модификаций, выбранных из: модификаций N-конца и/или C-конца; замены одного или нескольких аминокислотных остатков одним или несколькими неприродными аминокислотными остатками (например, замены одного или нескольких полярных аминокислотных остатков одной или несколькими изостерическими или изоэлектронными аминокислотами; замены одной или нескольких неполярных аминокислотных остатков другими неприродными изостерическими или изоэлектронными аминокислотами); добавления спейсерной группы; замены одного или нескольких чувствительных к окислению аминокислотных остатков одним или несколькими устойчивыми к окислению аминокислотными остатками; замены одного или нескольких аминокислотных остатков на аланин, замены одного или нескольких L-аминокислотных остатков одним или несколькими D-аминокислотными остатками; N-

алкилирования одной или нескольких амидных связей внутри бициклического пептидного лиганда; замены одной или нескольких пептидных связей суррогатной связью; модификации длины пептидного остова; замена водорода на альфа-углероде одного или нескольких аминокислотных остатков другой химической группой, модификации аминокислот, таких как цистеин, лизин, глутамат/аспартат и тирозин, подходящими аминами, тиолами, карбоновой кислотой и реагентами, реагирующими с фенолом, для функционализации указанных аминокислот, и введения или замены на аминокислоты, которые вводят ортогональные реакционноспособные группы, которые подходят для функционализации, например, аминокислоты, несущие азидные или алкиновые группы, которые позволяют функционализировать с помощью алкиновых или несущих азид фрагментов, соответственно.

В одном варианте осуществления модифицированное производное содержит модификацию на N-конце и/или C-конце. В дополнительном варианте осуществления, где модифицированное производное включает N-концевую модификацию с использованием подходящих химических реакций с аминогруппой, и/или C-концевую модификацию с использованием подходящих химических реакций с карбоксильной группой. В дополнительном варианте осуществления указанная N-концевая или C-концевая модификация включает добавление эффекторной группы, включая, но не ограничиваясь этим, цитотоксический агент, хелатирующий радиоактивное вещество агент или хромофор.

В другом варианте осуществления модифицированное производное содержит модификацию на N-конце. В другом варианте осуществления N-концевая модификация содержит N-концевую ацетильную группу. В этом варианте осуществления N-концевая цистеиновая группа (группа, обозначаемая в настоящем документе как C_i) блокирована уксусным ангидридом или другими подходящими реагентами во время пептидного синтеза, дающего молекулу, которая ацетируется на N-конце. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество удаления потенциальной точки распознавания для аминопептидаз и избегания возможности деградации бициклического пептида.

В альтернативном варианте осуществления N-концевая модификация включает добавление молекулярной спейсерной группы, которая облегчает конъюгацию эффекторных групп и сохранение активности бициклического пептида в отношении его мишени.

В дополнительном варианте осуществления модифицированное производное содержит C-концевую модификацию. В другом варианте осуществления C-концевая модификация содержит амидную группу. В этом варианте осуществления C-концевая цистеиновая группа (группа, обозначаемая в настоящем документе как C_{iii}) синтезируется как амид во время пептидного синтеза, дающего молекулу, которая амидирована на C-конце. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество удаления потенциальной точки распознавания для карбоксипептидаз и снижает вероятность протеолитической

деградации бициклического пептида.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или нескольких аминокислотных остатков одним или несколькими остатками неприродных аминокислот. В этом варианте осуществления могут быть выбраны неприродные аминокислоты, имеющие изостерические/изоэлектронные боковые цепи, которые не распознаются деградирующими протеазами и не оказывают какого-либо неблагоприятного воздействия на эффективность в отношении мишени.

В альтернативном варианте могут использоваться неприродные аминокислоты, имеющие ограниченные в степенях свободы боковые цепи аминокислот, так что протеолитический гидролиз соседней пептидной связи конформационно и стерически затруднен. В частности, они касаются аналогов пролина, объемных боковых цепей, α -дизамещенных производных (например, аминоизомаляновой кислоты, Aib) и циклоаминокислот, простым производным которых является аминоклопропилкарбоновая кислота.

В одном варианте осуществления изобретения модифицированное производное включает добавление спейсерной группы. В другом варианте осуществления модифицированное производное включает добавление спейсерной группы к N-концевому цистеину (C_i) и/или C-концевому цистеину (C_{iii}).

В одном варианте осуществления изобретения модифицированное производное включает замену одного или нескольких чувствительных к окислению аминокислотных остатков одним или несколькими устойчивыми к окислению аминокислотными остатками. В другом варианте осуществления модифицированное производное включает замену остатка триптофана остатком нафтилаланина или аланина. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество улучшения профиля фармацевтической стабильности полученного бициклического пептидного лиганда.

В одном варианте осуществления изобретения модифицированное производное включает замену одного или нескольких заряженных аминокислотных остатков одним или несколькими гидрофобными аминокислотными остатками. В альтернативном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или нескольких гидрофобных аминокислотных остатков одним или несколькими заряженными аминокислотными остатками. Правильный баланс заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков является важной характеристикой бициклических пептидных лигандов. Например, гидрофобные аминокислотные остатки влияют на степень связывания с белками плазмы и, таким образом, на концентрацию свободной доступной фракции в плазме, в то время как заряженные аминокислотные остатки (в частности, аргинин) могут влиять на взаимодействие пептида с фосфолипидными мембранами на поверхности клеток. Эти два типа остатков в комбинации могут влиять на время полужизни, объем распределения и экспозиции пептидного лекарственного средства, и могут быть адаптированы в соответствии с конечными клиническими требованиями. Кроме того, правильная комбинация и количество заряженных

аминокислотных остатков по сравнению с гидрофобными может уменьшить раздражение в месте инъекции (при подкожном введении пептидного лекарственного средства).

В одном варианте осуществления изобретения модифицированное производное включает замену одного или нескольких остатков L-аминокислоты одним или несколькими остатками D-аминокислоты. Полагают, что этот вариант осуществления увеличивает протеолитическую стабильность за счет стерических затруднений и склонности D-аминокислот к стабилизации конформации β -изгиба (Tugui et al (2005) PNAS, 102(2), 413-418).

В одном варианте осуществления изобретения модифицированное производное включает удаление любых аминокислотных остатков и замену их аланинами. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество удаления потенциального сайта (сайтов) протеолитической атаки.

Следует отметить, что каждая из вышеуказанных модификаций намеренно введена для улучшения эффективности или стабильности пептида. Дальнейшее улучшение эффективности на основе модификаций может быть достигнуто с помощью следующих механизмов:

- включения гидрофобных фрагментов, что за счет гидрофобного эффекта приводит к более низким скоростям диссоциации, так что достигается более высокое сродство;

- включения заряженных групп, что за счет дальнедействующих ионных взаимодействий приводит к более быстрым скоростям ассоциации и более высокому сродству (см., например, Schreiber et al, Rapid, electrostatically assisted association of proteins (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31); и

- включения в пептид дополнительных ограничений степеней свободы, например, путем корректного ограничения степеней свободы боковых цепей аминокислот, чтобы потеря энтропии была минимальной при связывании с мишенью, путем ограничения торсионных углов основной цепи, чтобы потеря энтропии была минимальной при связывании с мишенью, и введения дополнительных циклизаций в молекулу по тем же причинам.

(обзоры см. в Gentilucci et al, Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203, и Nestor et al, Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418).

Изотопные варианты

Настоящее изобретение включает все фармацевтически приемлемые (радио)изотопно-меченые пептидные лиганды по изобретению, в которых один или несколько атомов заменены атомами, имеющими тот же атомный номер, но атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе, и пептидные лиганды по изобретению, к которым присоединены хелатные группы с металлами (называемые «эффektorными»), которые способны удерживать соответствующие (радио)изотопы, и пептидные лиганды по изобретению, в которых некоторые функциональные группы ковалентно заменены

соответствующими (радио)изотопами или изотопно мечеными функциональными группами.

Примеры изотопов, подходящих для включения в пептидные лиганды по изобретению, включают изотопы водорода, такие как ^2H (D) и ^3H (T), углерод, такой как ^{12}C , ^{13}C и ^{14}C , хлор, такой как ^{36}Cl , фтор, такой как ^{18}F , йод, такой как ^{123}I , ^{125}I и ^{131}I , азот, такой как ^{13}N и ^{15}N , кислород, такой как ^{15}O , ^{17}O и ^{18}O , фосфор, такой как ^{32}P , серу, такую как ^{35}S , медь, такую как ^{64}Cu , галлий, такой как ^{67}Ga или ^{68}Ga , иттрий, такой как ^{90}Y , и лютеций, такой как ^{177}Lu , и висмут, такой как ^{213}Bi .

Некоторые изотопно-меченные пептидные лиганды по изобретению, например те, которые включают радиоактивный изотоп, полезны в исследованиях распределения лекарственных соединений и/или субстратов в тканях, а также для клинической оценки присутствия и/или отсутствия мишени нектин-4 в пораженных тканях. Пептидные лиганды по изобретению могут, кроме того, обладать ценными диагностическими свойствами, поскольку их можно использовать для обнаружения или идентификации образования комплекса между меченым соединением и другими молекулами, пептидами, белками, ферментами или рецепторами. В способах обнаружения или идентификации могут использоваться соединения, которые помечены метящими агентами, такими как радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные вещества, светящиеся вещества (например, люминол, производные люминола, люциферин, экворин и люцифераза) и т. Радиоактивные изотопы тритий, а именно ^3H (T), и углерод-14, а именно ^{14}C , особенно подходят для этой цели ввиду простоты их включения и готовых средств обнаружения.

Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, а именно ^2H (D), может обеспечить некоторые терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличенным периодом полужизни *in vivo* или уменьшенными требованиями к дозировке, и, таким образом, может быть предпочтительным при некоторых обстоятельствах.

Замещение изотопами, излучающими позитроны, такими как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , может быть полезным при исследованиях с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) для проверки распределения в мишени.

Меченые изотопами соединения пептидных лигандов по изобретению, как правило, могут быть получены обычными методами, известными специалистам в данной области, или способами, аналогичными тем, которые описаны в сопроводительных примерах, с использованием соответствующего меченого изотопом реагента вместо немеченого реагента, применяемого ранее.

Молекулярный каркас

Молекулярные каркасы описаны, например, в WO 2009/098450 и цитируемых там ссылках, в частности, в WO 2004/077062 и WO 2006/078161.

Как отмечено в предшествующих документах, молекулярный каркас может представлять собой низкомолекулярное соединение, например, низкомолекулярное органическое соединение.

В одном варианте осуществления изобретения молекулярный каркас может представлять собой макромолекулу. В одном варианте молекулярный каркас представляет собой макромолекулу, состоящую из аминокислот, нуклеотидов или углеводов.

В одном варианте осуществления изобретения молекулярный каркас содержит реакционноспособные группы, которые способны реагировать с функциональной группой (группами) полипептида с образованием ковалентных связей.

Молекулярный каркас может содержать химические группы, которые образуют связь с пептидом, такие как амины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, нитрилы, карбоновые кислоты, сложные эфиры, алкены, алкины, азиды, ангидриды, сукцинимиды, малеимиды, алкилгалогениды и ацилгалогениды.

В одном варианте осуществления изобретения молекулярный каркас может содержать или может состоять из гексагидро-1,3,5-триазина, особенно 1,3-триакрилоилгексагидро-1,3,5-триазина («ТАТА») или его производного.

В одном варианте осуществления изобретения молекулярный каркас представляет собой 2,4,6-трис(бромметил)мезитилен. Эта молекула похожа на 1,3-трис(бромметил)бензол (ТВМВ), но содержит три дополнительные метильные группы, присоединенные к бензольному кольцу. Это имеет то преимущество, что дополнительные метильные группы могут образовывать дополнительные контакты с полипептидом и, следовательно, создавать дополнительные структурные ограничения.

Молекулярный каркас по изобретению содержит химические группы, которые позволяют функциональным группам полипептида кодируемой библиотеки по изобретению образовывать ковалентные связи с молекулярным каркасом. Указанные химические группы выбираются из широкого диапазона функциональных групп, включая амины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, нитрилы, карбоновые кислоты, сложные эфиры, алкены, алкины, ангидриды, сукцинимиды, малеимиды, азиды, алкилгалогениды и ацилгалогениды.

Реакционноспособные группы каркаса, которые можно использовать на молекулярном каркасе для реакции с тиоловыми группами цистеинов, представляют собой алкилгалогениды (или также называемые галогеноалканами или галогеналканами).

Примеры включают бромметилбензол (реакционноспособная группа каркаса, примером является ТВМВ) или йодацетамид. Другие реакционноспособные группы каркаса, которые используются для селективного связывания соединений с цистеинами в белках, представляют собой малеимиды, $\alpha\beta$ -ненасыщенные карбонилсодержащие соединения и α -галогенметилкарбонилсодержащие соединения. Примеры малеимидов, которые можно использовать в качестве молекулярных каркасов в изобретении, включают: трис-(2-малеимидоэтил)амин, трис-(2-малеимидоэтил)бензол, трис-(малеимидо)бензол. Примером $\alpha\beta$ -ненасыщенного карбонилсодержащего соединения является 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА) (Angewandte Chemie, International Edition (2014), 53 (6), 1602-1606). Примером α -галогенметилкарбонилсодержащего соединения является N, N',N''-(бензол-1,3-

триил)трис(2-бромацетамид)). Селеноцистеин также является природной аминокислотой, которая имеет такую же реакционную способность, что и цистеин, и может использоваться для тех же реакций. Таким образом, везде, где упоминается цистеин, обычно допустима замена на селеноцистеин, если контекст не предполагает иное.

Синтез

Пептиды по настоящему изобретению могут быть получены синтетическим путем стандартными методами с последующей реакцией с молекулярным каркасом *in vitro*. После этого процесса можно использовать стандартные химические реакции. Это дает возможность быстрого получения растворимого материала в больших масштабах для дальнейших экспериментов или проверки. Такие способы могут быть реализованы с использованием обычных химических методов, таких как описанные у Timmerman et al (*supra*).

Таким образом, изобретение также относится к получению полипептидов или конъюгатов, выбранных, как изложено в данном документе, где получение включает дополнительные необязательные стадии, описанные ниже. В одном варианте осуществления эти стадии проводят с конечным продуктом полипептидом/конъюгатом, полученным путем химического синтеза.

Необязательно, аминокислотные остатки в интересующем полипептиде могут быть заменены при получении конъюгата или комплекса.

Пептиды также могут быть удлинены, например, для включения другой петли и, следовательно, для введения возможности связывания с несколькими мишенями.

Чтобы удлинить пептид, его можно просто химически удлинить по его N-концу или C-концу или внутри петель с использованием ортогонально защищенных лизинов (и аналогов) с использованием стандартных методов твердофазного синтеза или методов синтеза в растворе. Стандартные методики (био)конъюгации могут использоваться для введения активированного или активируемого N- или C-конца. В альтернативном варианте, добавление фрагментов можно осуществить конденсацией фрагментов или естественным химическим лигированием, например, как описано в (Dawson et al. 1994. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science* 266:776-779), или с помощью ферментов, например, с использованием субтилигазы, как описано в (Chang et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 20; 91(26):12544-8 или в Hikari et al *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003).

В альтернативном варианте, пептиды можно удлинить или модифицировать путем дополнительной конъюгации через дисульфидные связи. Этот способ имеет дополнительное преимущество в том, что он позволяет первому и второму пептиду диссоциировать при попадании в восстановительную среду в клетке. В этом случае молекулярный каркас (например, ТВМВ) может быть добавлен во время химического синтеза первого пептида, чтобы прореагировать с тремя цистеиновыми группами; затем к N- или C-концу первого пептида может быть присоединен дополнительный цистеин или тиол, так что этот цистеин или тиол вступает в реакцию только со свободным цистеином

или тиолом второго пептида с образованием дисульфидно-связанного бициклического пептид-пептидного конъюгата.

Аналогичные методики в равной степени применимы к синтезу/связыванию двух бициклических и биспецифичных макроциклов с возможностью создания тетраспецифичной молекулы.

Кроме того, добавление других функциональных или эффекторных групп может быть выполнено таким же образом, с использованием соответствующих химических реакций, присоединения на N- или C-концах или через боковые цепи. В одном варианте осуществления присоединение осуществляется таким образом, что оно не блокирует активность ни одного объекта.

Фармацевтические композиции

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая пептидный лиганд, описанный в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями.

В общем, пептидные лиганды по настоящему изобретению будут использоваться в очищенной форме вместе с фармакологически подходящими наполнителями или носителями. Обычно эти эксципиенты или носители включают водные или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и/или забуференные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, а также раствор Рингера с лактатом. Подходящие физиологически приемлемые адъюванты, если необходимо поддерживать полипептидный комплекс в суспензии, могут быть выбраны из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Внутривенные носители включают составы, восполняющие жидкость и питательные вещества, и электролиты, например, на основе декстрозы Рингера. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы (Mask (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е издание).

Пептидные лиганды по настоящему изобретению можно использовать в виде отдельно вводимых композиций или в сочетании с другими агентами. Они могут включать антитела, фрагменты антител и различные иммунотерапевтические препараты, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамицин или цисплатин, а также иммунотоксины. Фармацевтические композиции могут включать «коктейли» различных цитотоксических или других агентов в сочетании с белковыми лигандами по настоящему изобретению или даже комбинацией выбранных полипептидов по настоящему изобретению, обладающих различной специфичностью, таких как полипептиды, выбранные с использованием различных мишеней лигандов, независимо от того, объединяются ли они до введения.

Путь введения фармацевтических композиций согласно изобретению может

представлять собой любой из способов, обычно известных специалистам в данной области. Для лечения пептидные лиганды по изобретению можно вводить любому пациенту в соответствии со стандартными методами. Введение может осуществляться любым подходящим способом, включая парентеральный, внутривенный, внутримышечный, внутривнутрибрюшинный, трансдермальный способы, введение через легкие, или также, при необходимости, путем прямой инфузии с помощью катетера. Предпочтительно, чтобы фармацевтические композиции согласно изобретению вводили путем ингаляции. Дозировка и частота введения будут зависеть от возраста, пола и состояния пациента, одновременного приема других лекарств, противопоказаний и других параметров, которые должны быть приняты во внимание лечащим врачом.

Пептидные лиганды по настоящему изобретению могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в подходящем носителе перед использованием. Было показано, что этот метод является эффективным, и можно использовать известные в данной области методы лиофилизации и восстановления. Специалистам в данной области будет понятно, что лиофилизация и восстановление могут приводить к различной степени потери активности и что уровни, возможно, придется отрегулировать в сторону увеличения для компенсации.

Композиции, содержащие пептидные лиганды по настоящему изобретению или их коктейль, можно вводить для профилактического и/или терапевтического лечения. В некоторых вариантах терапевтического применения количество, достаточное для достижения по меньшей мере частичного ингибирования, подавления, модуляции, уничтожения или какого-либо другого измеримого параметра популяции выбранных клеток, определяется как «терапевтически эффективная доза». Количества, необходимые для достижения этой дозировки, будут зависеть от тяжести заболевания и общего состояния собственной иммунной системы пациента, но обычно варьируются от 0,005 до 5,0 мг выбранного пептидного лиганда на килограмм веса тела, причем чаще всего используются дозы от 0,05 до 2,0 мг/кг/доза. Для профилактических целей композиции, включающие представленные пептидные лиганды или их смеси, могут также вводиться в аналогичных или немного меньших дозах.

Композиция, содержащая пептидный лиганд в соответствии с настоящим изобретением, может использоваться в профилактических и терапевтических целях для помощи в изменении, инактивации, уничтожении или удалении выбранной популяции клеток-мишеней у млекопитающего. Кроме того, описанные в настоящем документе пептидные лиганды можно использовать экстракорпорально или селективно *in vitro* для уничтожения, истощения или иного эффективного удаления популяции клеток-мишеней из гетерогенного набора клеток. Кровь млекопитающего может быть экстракорпорально объединена с выбранными пептидными лигандами, в результате чего нежелательные клетки уничтожаются или иным образом удаляются из крови для возврата млекопитающему в соответствии со стандартными методами.

Терапевтическое применение

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложен гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, описанный в настоящем документе, для применения в профилактике, подавлении или лечении рака.

Примеры раковых заболеваний (и их доброкачественных аналогов), которые можно лечить (или ингибировать) включают, но не ограничиваются этим, опухоли эпителиального происхождения (аденомы и карциномы различных типов, включая аденокарциномы, плоскоклеточный рак, переходные клеточные карциномы и другие карциномы), такие как карциномы мочевого пузыря и мочевых путей, молочной железы, желудочно-кишечного тракта (включая карциномы пищевода, желудка (желудочные), тонкой кишки, толстой кишки, прямой кишки и заднего прохода), печени (гепатоцеллюлярную карциному), желчного пузыря и желчевыводительной системы, экзокринной части поджелудочной железы, почек, легких (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легких, немелкоклеточные карциномы легких, бронхоальвеолярные карциномы и мезотелиомы), карциномы головы и шеи (например, рак языка, ротовой полости, гортани, глотки, носоглотки, миндалин, слюнных желез, полости носа и околоносовых пазух), яичников, маточных труб, брюшины, влагалища, вульвы, пениса, шейки матки, миометрия, эндометрия, щитовидной железы (например, фолликулярную карциному щитовидной железы), надпочечников, предстательной железы, кожи и прилежащих органов (например, меланому, базальноклеточную карциному, сквамозноклеточную карциному, кератоакантому, диспластический невус); гематологические злокачественные опухоли (например, лейкозы, лимфомы) и предраковые гематологические нарушения и нарушения с пограничной злокачественностью, включая гематологические злокачественные заболевания и связанные с ними состояния клеток лимфоидного ряда (например, острый лимфоцитарный лейкоз [ALL], хронический лимфоцитарный лейкоз [CLL], В-клеточные лимфомы, такие как диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома [DLBCL], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, лимфома клеток мантийной зоны, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы натуральных клеток-киллеров [NK], лимфомы Ходжкина, лейкоз ворсистых клеток, моноклональную гаммапатию неясного генеза, плазмцитому, множественную миелому и лимфопролиферативные нарушения после трансплантации), а также гематологические злокачественные и родственные состояния клеток миелоидного ряда (например, острый миелогенный лейкоз [AML], хронический миелогенный лейкоз [CMML], хронический миеломоноцитарный лейкоз [CMML], гиперэозинофильный синдром, миелопролиферативные расстройства, такие как полицитемия вера, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелопролиферативный синдром, синдром миелодисплазии и промиелоцитарный лейкоз); опухоли мезенхимального происхождения, например, саркомы мягких тканей, кости или хряща, такие как остеосаркомы, фибросаркомы, хондросаркомы, рабдомиосаркомы, лейомиосаркомы, липосаркомы, ангиосаркомы, саркому Капоши, саркому Юинга, синовиальную саркому, эпителиоидные саркомы, желудочно-кишечные стромальные

опухоли, доброкачественные и злокачественные гистоцитомы и дерматофибросаркому протуберанс; опухоли центральной или периферической нервной системы (например, астроцитомы, глиомы и глиобластомы, менингиомы, эпендимомы, опухоли эпифиза и шванномы); эндокринные опухоли (например, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли островковых клеток, опухоли парашитовидных желез, карциноидные опухоли и медуллярную карциному щитовидной железы); опухоли глаз и их придатков (например, ретинобластому); опухоли зародышевых клеток и трофобласта (например, тератомы, семиномы, дисгерминомы, пузырьный занос и хориокарциному); и педиатрические и эмбриональные опухоли (например, медуллобластомы, нейробластомы, опухоль Вильмса и примитивные нейроэктодермальные опухоли); или синдромы, врожденные или иные, которые делают больного восприимчивым к злокачественному новообразованию (например, пигментную ксеродерму).

В дополнительном варианте осуществления рак выбран из гематологических злокачественных заболеваний, таких как: неходжкинская лимфома (NHL), лимфома Беркитта (BL), множественная миелома (MM), В-клеточный хронический лимфолейкоз (B-CLL), В- и Т-клеточный острый лимфолейкоз (ALL), Т-клеточная лимфома (TCL), острый миелоидный лейкоз (AML), лейкоз ворсистых клеток (HCL), лимфома Ходжкина (HL) и хронический миелоидный лейкоз (CML).

Ссылки в данном документе на термин «профилактика» включают введение защитной композиции до начала заболевания. «Подавление» относится к введению композиции после события начала, но до клинического проявления заболевания. «Лечение» включает введение защитной композиции после появления симптомов заболевания.

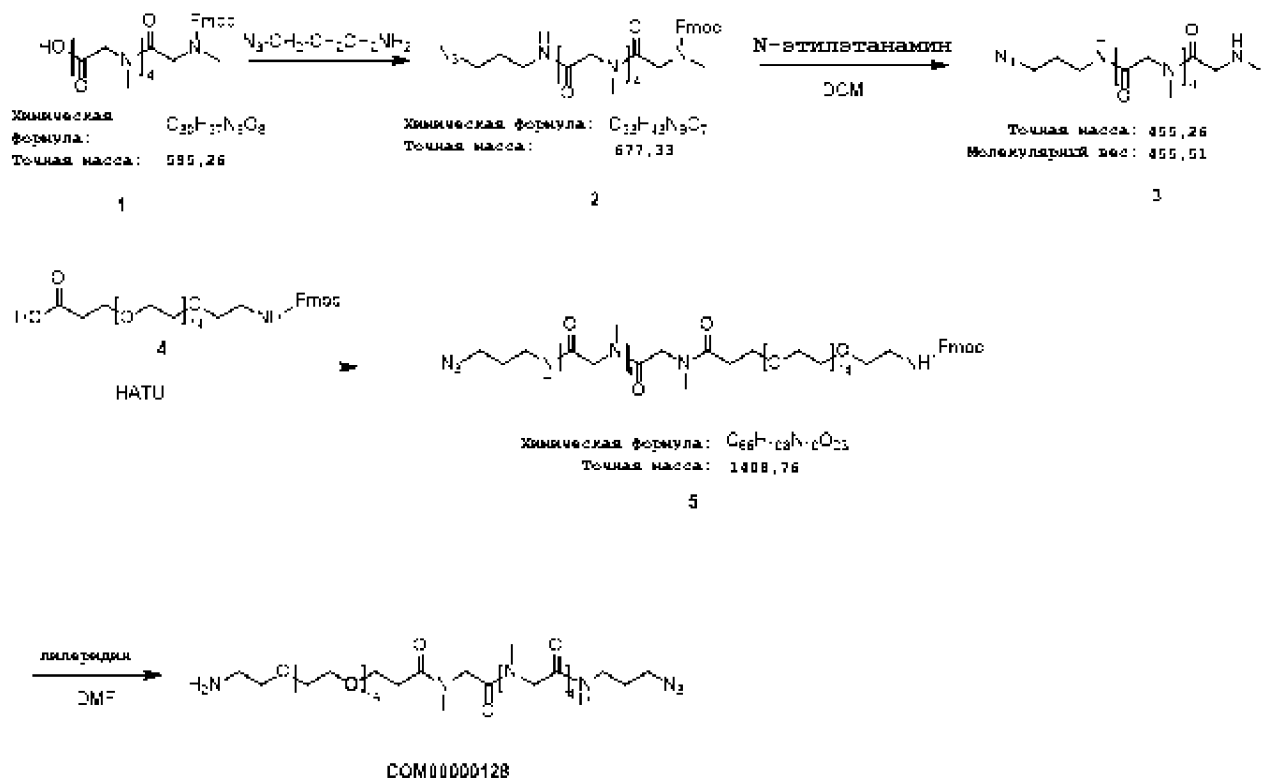
Доступны модельные системы на животных, которые можно использовать для скрининга эффективности пептидных лигандов при защите или лечении заболевания. Настоящее изобретение облегчает использование модельных систем на животных, что позволяет разрабатывать полипептидные лиганды, которые могут перекрестно реагировать с мишенями у человека и животных, что позволяет использовать модели на животных.

Изобретение более подробно описано ниже со ссылкой на следующие примеры.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Синтез линкеров

COM 128



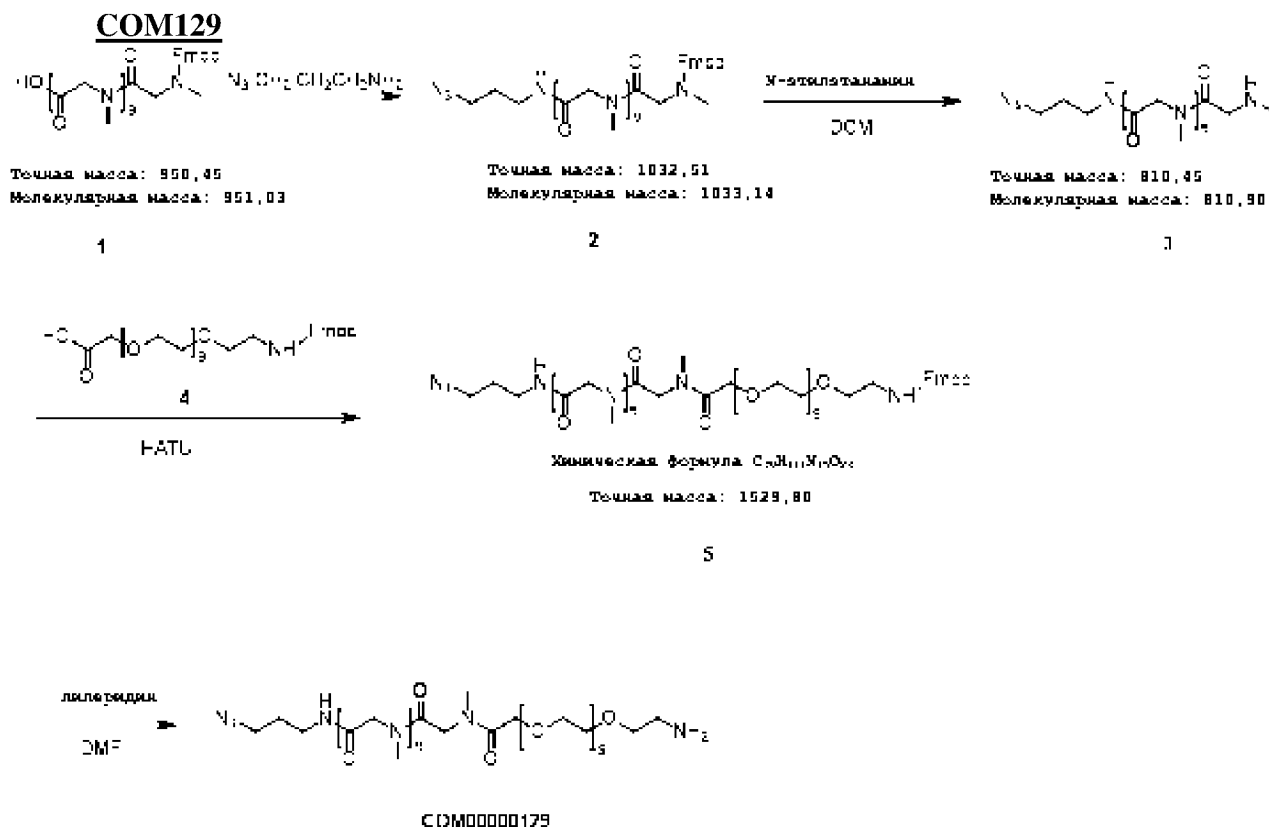
Смесь соединения 1 (700,0 мг, 1,18 ммоль, 1,0 экв.), 3-азидопропан-1-амина (117,66 мг, 1,18 ммоль, 1,0 экв.), EDCI (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид, 270,4 мг, 1,41 ммоль, 1,2 экв.), HOBT (1-гидроксибензотриазол, 190,6 мг, 1,41 ммоль, 1,2 экв.) растворяли в DCM (дихлорметане, 20 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), а затем смесь перемешивали при 20-25°C в течение 1 часа в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 677,33, наблюдаемое m/z : 678,2 ($[M+H]^+$)). Растворитель выпаривали, получая соединение 2 (600 мг, неочищенное) в виде белого твердого вещества.

Смесь соединения 2 (600,0 мг, 885,3 мкмоль, 1,0 экв.), N-этилэтанамин (1,29 г, 15,19 ммоль, 1,50 мл, 17,2 экв.) растворяли в DCM (3 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 455,51, наблюдаемое m/z : 456,3 ($[M+H]^+$)). Растворитель выпаривали, получая соединение 3 (400 мг, неочищенное) в виде бесцветного масла.

Смесь соединения 3 (150,0 мг, 329,3 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 4 (320,1 мг, 329,3 мкмоль, 1,0 экв.), HATU (125,2 мг, 329,3 мкмоль, 1,0 экв.), DIEA (42,6 мг, 329,3 мкмоль, 57,4 мкл, 1,0 экв.) растворяли в DMF (2 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 дней в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 1408,76, наблюдаемое m/z : 705,3 ($[M/2+H]^+$)). Растворитель выпаривали, получая соединение 5 (400 мг, неочищенное) в

виде желтого масла.

Соединение 5 (400 мг, 283,77 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в DMF (диметилформамиде, 4 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза) с последующим добавлением пиперидина (862,2 мг, 10,13 ммоль, 1 мл, 35,7 экв.), и затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 15 минут в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 5 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 1187,37, наблюдаемое m/z: 594,4 ([M/2+H⁺], 1187,4 ([M+H]⁺)). Растворитель выпаривали, получая соединение COM128 (250 мг, неочищенное) в виде бесцветного масла.



Смесь соединения 1 (1,4 г, 1,47 ммоль, 1,0 экв.), 3-азидопропан-1-амина (162,1 мг, 1,62 ммоль, 1,1 экв.), EDCI (338,6 мг, 1,77 ммоль, 1,2 экв.), HOBT (238,7 мг, 1,77 ммоль, 1,2 экв.) растворяли в DCM (5 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем смесь перемешивали при 20-25°C в течение 1 часа в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 1033,14, наблюдаемое m/z: 1033,2 ([M+H]⁺)). Реакционную смесь обрабатывали несколькими каплями 1 М HCl, и органический слой упаривали при пониженном давлении для удаления растворителя. Соединение 2 (1,1 г, неочищенное) получали в виде желтого масла.

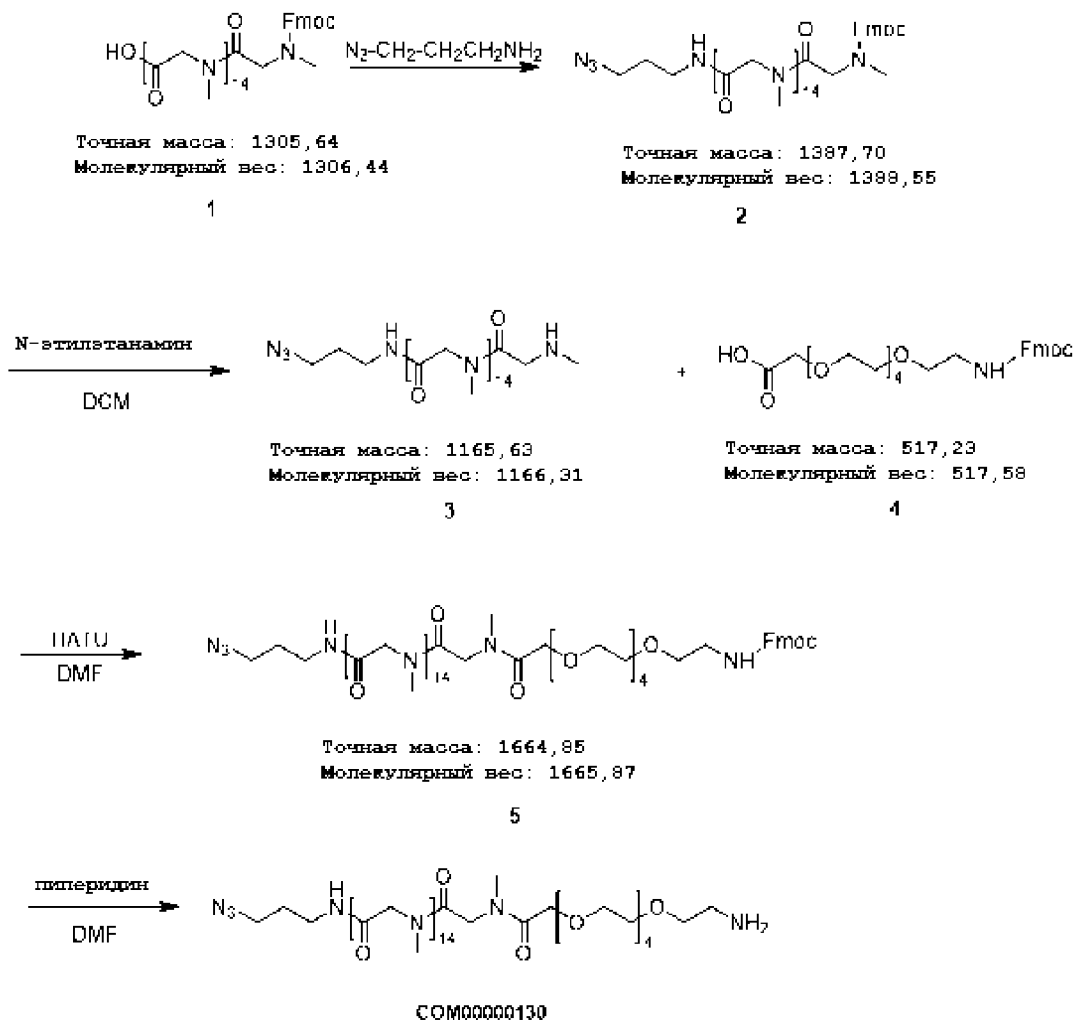
Смесь соединения 2 (1,1 г, 1,06 ммоль, 1 экв.), N-этилэтанамина (3,89 г, 53,24 ммоль, 5,48 мл, 50 экв.) растворяли в DCM (5 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем смесь перемешивали при 20-25°C в течение 1 часа в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано,

и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 810,90, наблюдаемое m/z : 810,9 ($[M+H]^+$)). Реакционную смесь упаривали при пониженном давлении и получали соединение 3 (810 мг, неочищенное) в виде белого твердого вещества.

Смесь соединения 3 (810,0 мг, 998,9 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 4 (810,7 мг, 1,10 ммоль, 1,1 экв.), НАТУ (гексафторфосфат азабензотриазолтетраметилурия, 455,8 мг, 1,20 ммоль, 1,2 экв.), DIEA (258,2 мг, 2,00 ммоль, 348,0 мкл, 2,0 экв.) растворяли в DMF (2 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 дней в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 1530,72, наблюдаемое m/z : 765,5 ($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь обрабатывали несколькими каплями 1 М HCl, органический слой собирали и упаривали при пониженном давлении для удаления растворителя. Соединение 5 (1,1 г, неочищенное) получали в виде желтого твердого вещества.

Соединение 5 (1 г, 653,29 мкмоль, 1 экв.) растворяли в DCM (10 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза) с последующим добавлением пиперидина (2,39 г, 32,66 ммоль, 3,36 мл, 50 экв.), а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что соединение 5 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 1308,47, наблюдаемое m/z : 1308,4 ($[M+H]^+$)). Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA (трифторуксусной кислоты): фаза А: 0,075% TFA в H_2O , фаза В: MeCN, колонка: Luna 200×25 мм, 10 мкм, C18, 110А и Gemini 150×30 мм, C18, 5 мкм, 110А, подключение, 50°C). COM129 (700 мг, 463,72 мкмоль, выход 70,98%) получали в виде желтого твердого вещества.

COM130



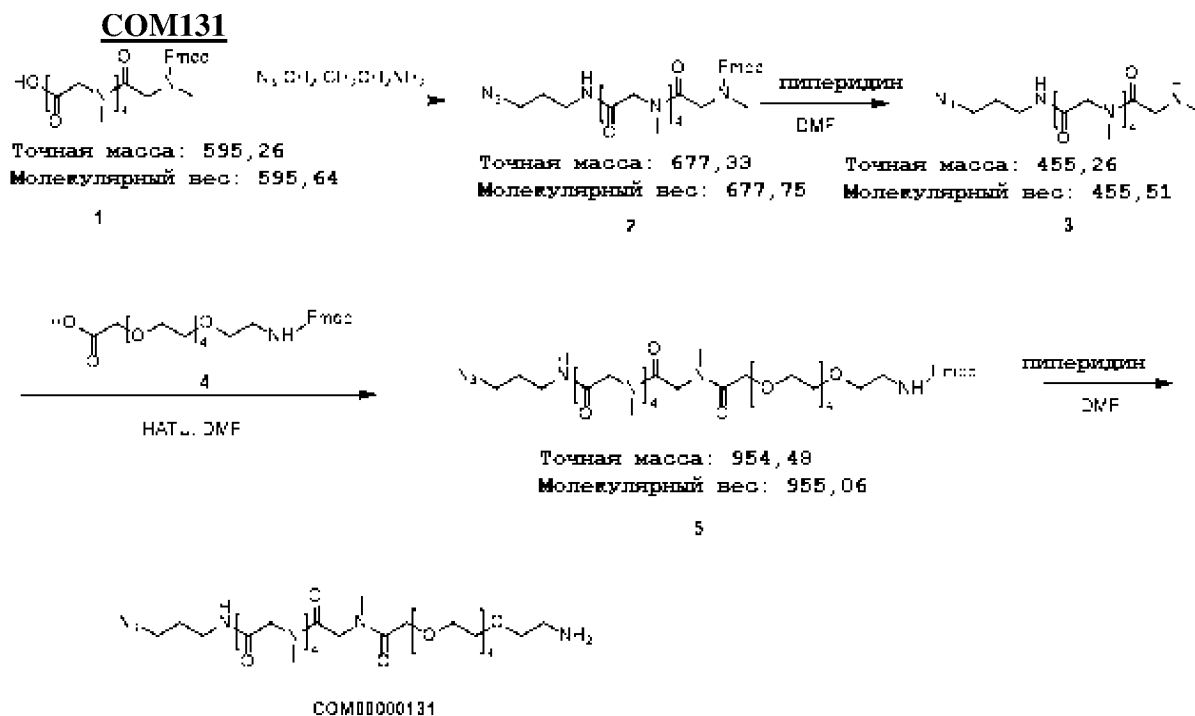
Смесь соединения 1 (291 мг, 222,75 мкмоль, 1,0 экв.), 3-азидопропан-1-амина (24,53 мг, 245,02 мкмоль, 1,1 экв.), EDCI (51,24 мг, 267,30 мкмоль, 1,2 экв.), HOBT (36,12 мг, 267,30 мкмоль, 1,2 экв.) растворяли в DCM (3 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), а затем смесь перемешивали при 20-25°C в течение 1 часа в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что соединение 1 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 1388,53, наблюдаемое m/z : 694,7 ($[M/2+H]^+$)). Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях). Соединение 2 (200 мг, 144,04 мкмоль, выход 64,66%) получали в виде белого твердого вещества.

Смесь соединения 2 (200 мг, 144,04 мкмоль, 1,0 экв.), N-этилэтанамина (210,7 мг, 2,88 ммоль, 297 мкл, 20,0 экв.) растворяли в DCM (3 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), а затем смесь перемешивали при 20-25°C в течение 1 часа в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 1166,29, наблюдаемое m/z : 1166,3 ($[M+H]^+$)). Реакционную смесь упаривали и получали соединение 3 (150 мг, неочищенное) в виде желтого масла.

Смесь соединения 3 (150 мг, 128,61 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 4 (75 мг, 144,91 мкмоль, 1,13 экв.), HATU (58,7 мг, 154,34 мкмоль, 1,2 экв.) и DIEA

(диизопропилэтиламин, 33,24 мг, 257,23 мкмоль, 44,80 мкл, 2,0 экв.) растворяли в DMF (5 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем смесь перемешивали при 20-25°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 1665,84, наблюдаемое m/z: 833,2 ([M/2+H]⁺)). Растворитель удаляли при пониженном давлении и получали соединение 5 (300 мг, неочищенное) в виде желтого масла.

К неочищенному соединению 5 (300 мг, растворенному в 10 мл DMF) добавляли пиперидин (2 мл), и смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 1443,60, наблюдаемое m/z: 722,7 ([M/2+H]⁺)). Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях). COM130 (140 мг, 58,19 мкмоль, выход 32,31%, чистота 60%) получали в виде белого твердого вещества.



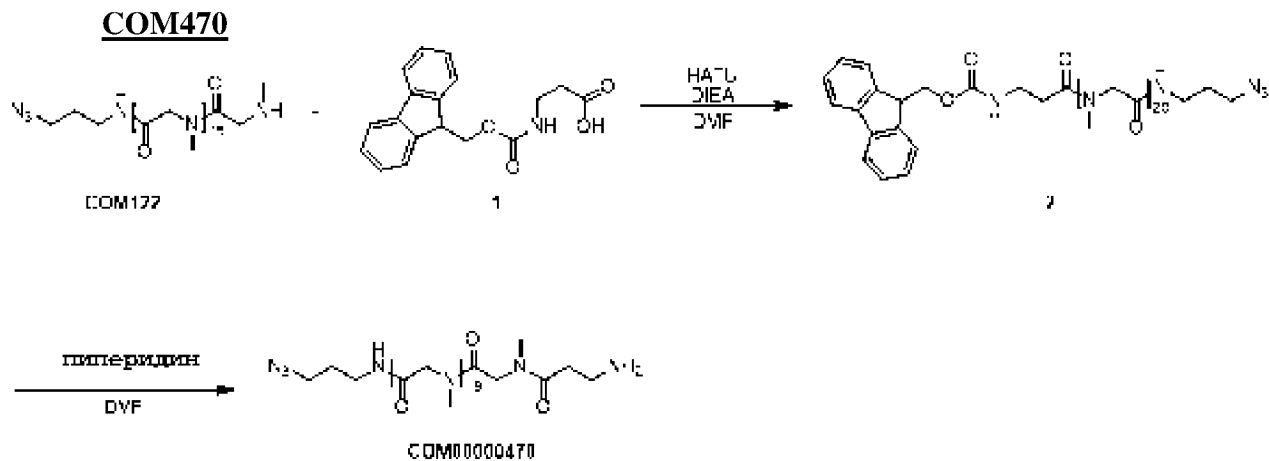
Смесь соединения 1 (700,0 мг, 1,18 ммоль, 1,0 экв.), 3-азидопропан-1-амина (117,7 мг, 1,18 ммоль, 1,0 экв.), HOBT (190,6 мг, 1,41 ммоль, 1,2 экв.), EDCI (270,4 мг, 1,41 ммоль, 1,2 экв.) растворяли в DCM (20 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 677,75, наблюдаемое m/z: 678,2 ([M+H]⁺)). Реакционную смесь обрабатывали несколькими каплями 1 М HCl, органический слой собирали и упаривали при пониженном давлении. Соединение 2 (600,0 мг, неочищенное) получали в виде белого твердого вещества.

Соединение 2 (600,0 мг, 885,2 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в DMF (3 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли пиперидин (1,29

г, 15,19 ммоль, 1,50 мл, 17,2 экв.), и смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 455,51, наблюдаемое m/z: 456,3 ([M+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали соединение 3 (400,0 мг, 879,1 мкмоль) в виде бесцветного масла.

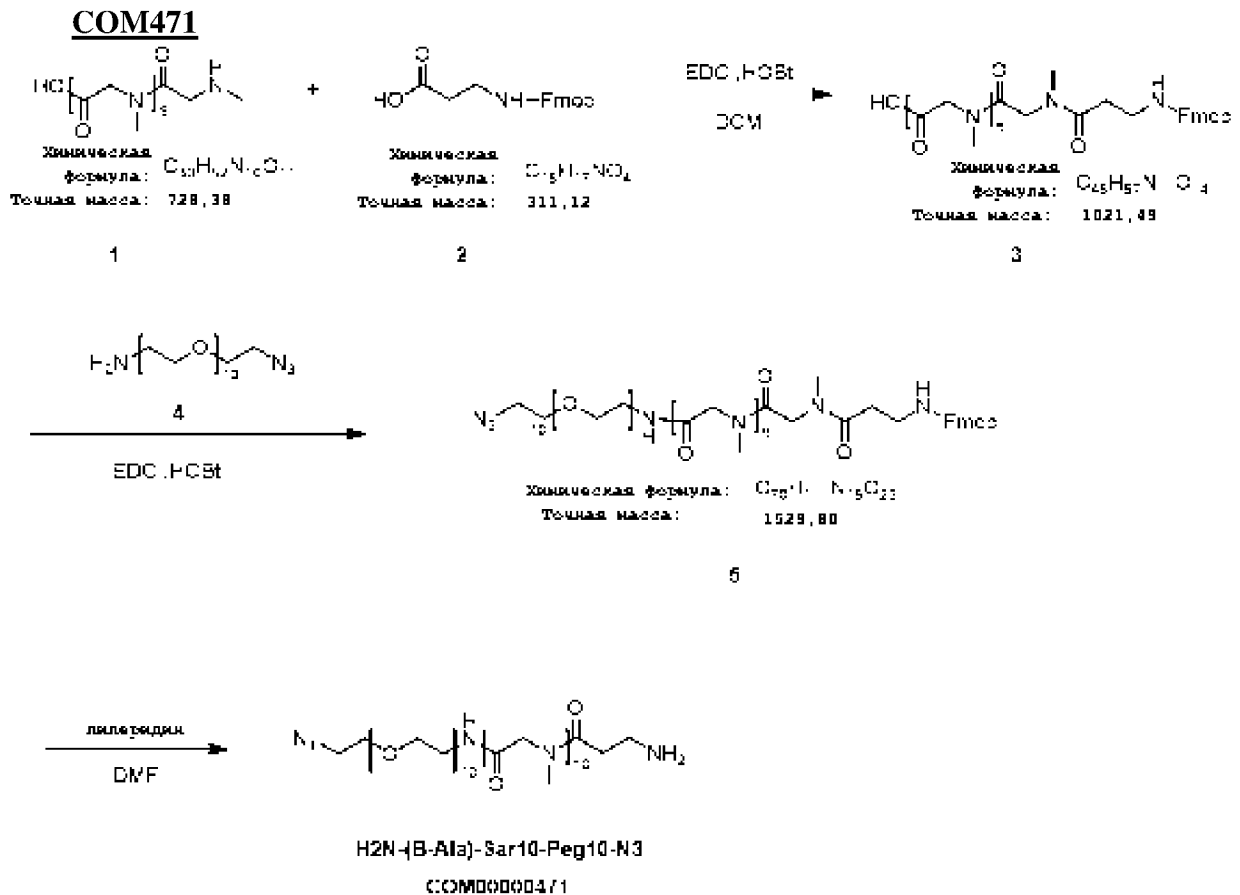
Смешивали соединение 3 (250,0 мг, 548,83 мкмоль, 1,0 экв.), соединение 4 (284,1 мг, 548,83 мкмоль, 1 экв.), HATU (229,6 мг, 603,72 мкмоль, 1,1 экв.), DIEA (141,9 мг, 1,10 ммоль, 191,19 мкл, 2,0 экв.) в DCM (20 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 955,06, наблюдаемое m/z: 955,6 ([M+H]⁺)). Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 5 (400,0 мг, 419,1 мкмоль) получали в виде белого твердого вещества.

Смесь соединения 5 (400,0 мг, 418,82 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в DMF (4 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли пиперидин (862,2 мг, 10,13 ммоль, 1 мл, 24,2 экв), и смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 5 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 732,83 наблюдаемое m/z: 733,3 ([M+H]⁺)). Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). COM131 (200 мг, 272,9 мкмоль) получали в виде бесцветного масла.



К раствору COM122 (228 мг, 149,83 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 1 (51,31 мг, 164,82 мкмоль, 1,1 экв.) в DMF (6 мл) добавляли HATU (85,40 мг, 224,75 мкмоль, 1,5 экв.) и DIEA (19,37 мг, 149,83 мкмоль, 26,10 мкл, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 1 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 1814,99, наблюдаемое m/z: 908,2 ([M/2+H]⁺)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях). Соединение 2 (54 мг, 29,75 мкмоль, выход 19,86%) получали в виде белого твердого вещества.

К раствору соединения 2 (54 мг, 29,8 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (2 мл) добавляли пиперидин (61 мг, 715 мкмоль, 71 мкл, 24,0 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 1592,75 m/z : 796,27 ($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). COM470 (40 мг, 25,11 мкмоль, выход 84,41%) получали в виде белого твердого вещества.

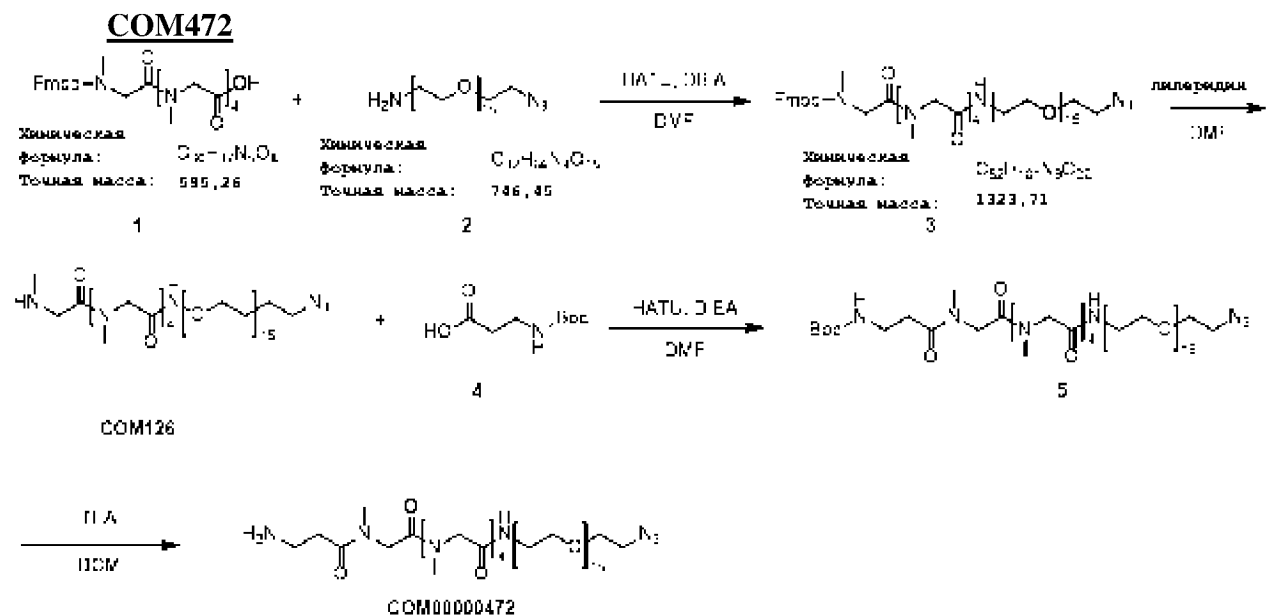


Смесь соединения 1 (900 мг, 1,23 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 2 (1,0 г, 3,21 ммоль, 2,6 экв.) растворяли в DCM (20 мл) с последующим добавлением (284,0 мг, 1,48 ммоль, 1,2 экв.), HOBT (200,2 мг, 1,48 ммоль, 1,2 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один пик с желаемым m/z (расчетный MW: 1021,49, наблюдаемое m/z : 1022,2 ($[M+H]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (0,900 г, 880,53 мкмоль, выход 71,30%) получали в виде белого твердого вещества.

Смесь соединения 3 (500,0 мг, 489,19 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 4 (257,6 мг, 489,19 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в DCM (5 мл) с последующим добавлением HOBT (132,2 мг, 978,37 мкмоль, 2,0 экв.), EDCI (187,6 мг, 978,37 мкмоль, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z

(наблюдаемый MW: 1529,80 m/z. 765,9 ($[M/2+H]^+$). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях). Соединение 3 (420 мг, 246,94 мкмоль, выход 50,48%) получали в виде бесцветного масла.

Соединение 5 (420 мг, 274,38 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в DMF (4 мл) с последующим добавлением пиперидина (865,2 мг, 10,16 ммоль, 1 мл, 37 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 5 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 1308,48, наблюдаемое m/z: 654,8 ($[M/2+H]^+$). Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). COM471 (386 мг, 265,50 мкмоль, выход 96,76%) получали в виде бесцветного масла.

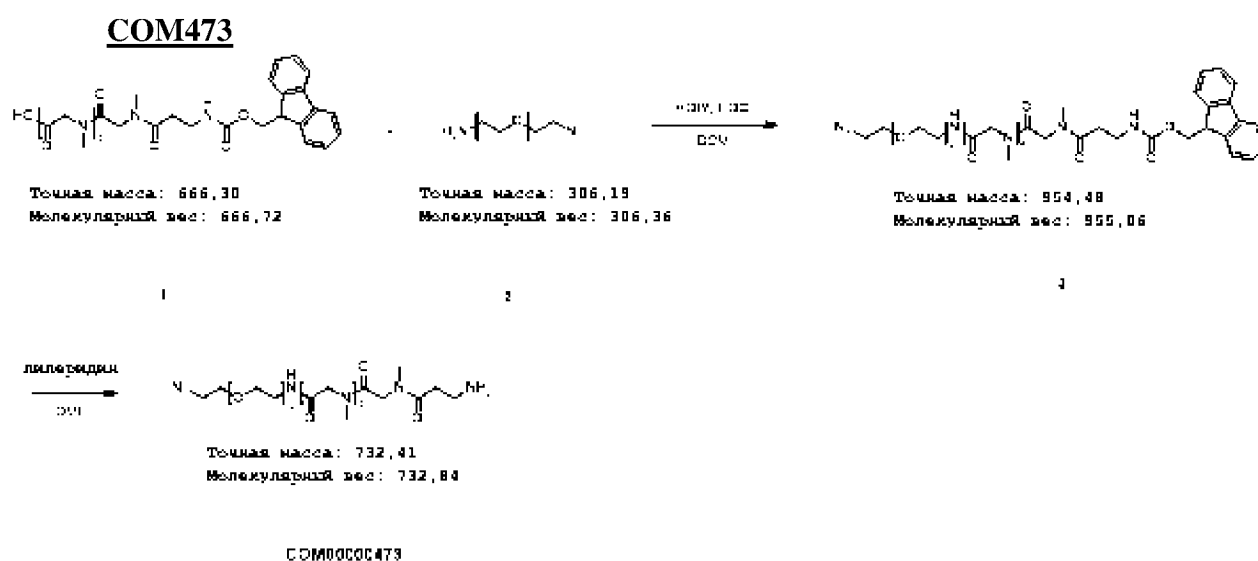


Смесь соединения 1 (0,5 г, 839,43 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 2 (627,0 мг, 839,43 мкмоль, 1,0 экв.) и DIEA (217,0 мг, 1,68 ммоль, 292,4 мкл, 2,0 экв.) растворяли в DMF (2 мл), затем к смеси добавляли HATU (319,2 мг, 839,4 мкмоль, 1,0 экв.). Затем смесь перемешивали при 25°C в течение 30 минут. ТСХ (DCM: CH₃OH=10:1, R_f=0,24) показала, что соединение 1 было полностью израсходовано, и образовалось одно новое пятно. Растворитель выпаривали, получая соединение 3 (0,45 г, 339,75 мкмоль, выход 40,47%, неочищенное) в виде бесцветного масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Соединение 3 (450,0 мг, 339,75 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в DMF (8 мл) с последующим добавлением пиперидина (2 мл). Смесь перемешивали в течение 15 минут при 25°C. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемой массой (рассчитанная MW: 1102,27, наблюдаемое m/z: 552,1 ($[M/2+H]^+$). Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (370,0 мг, 335,67 мкмоль, выход 98,80%) получали в виде бесцветного масла.

К раствору COM126 (60 мг, 54,45 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 4 (15,5 мг, 81,68 мкмоль, 1,5 экв.) в DMF (5 мл) добавляли HATU (31 мг, 81,68 мкмоль, 1,5 экв.) и DIEA (10,5 мг, 61,68 мкмоль, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что COM126 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемой массой. Смесь выпаривали для удаления растворителя и получали соединение 5 (30 мг, неочищенное) в виде бесцветного масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

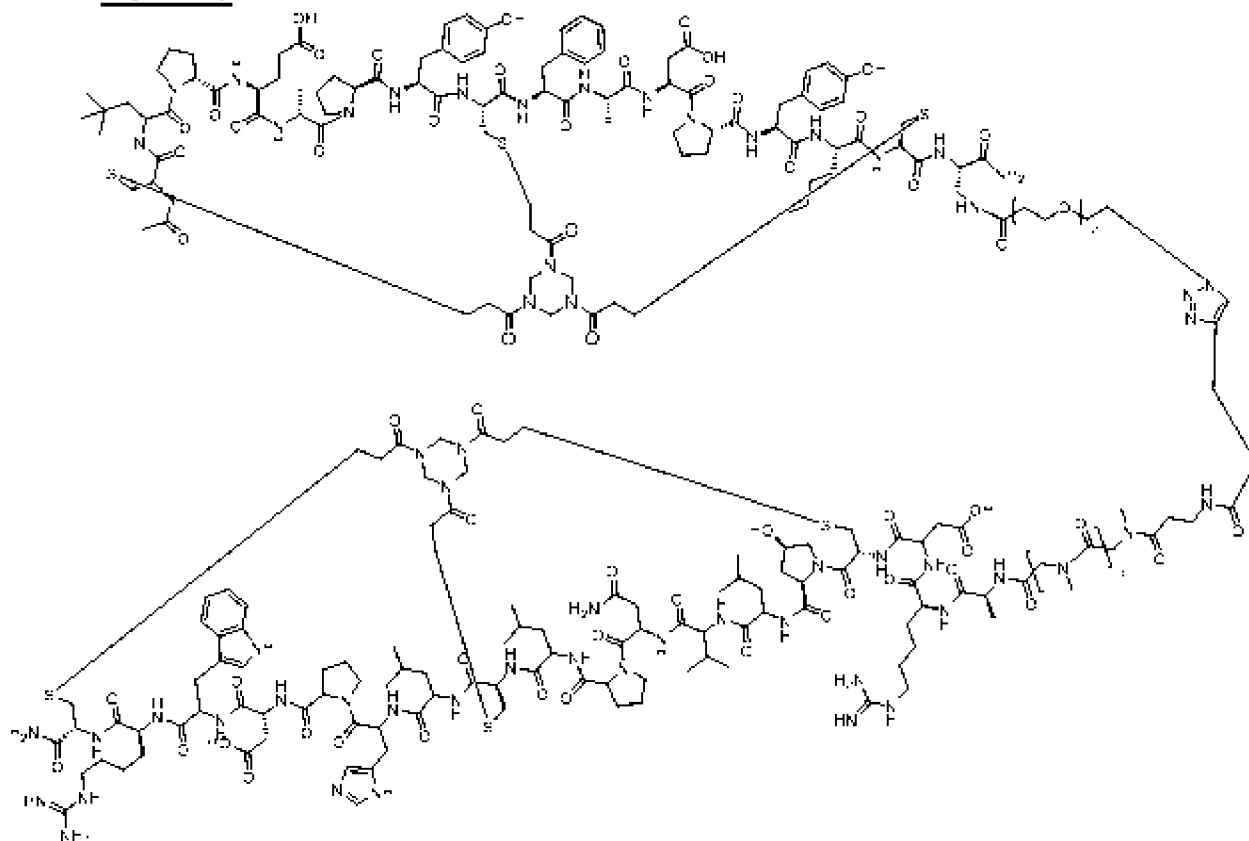
Соединение 5 (30 мг, 23,57 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в DCM (4,5 мл), а затем добавляли TFA (0,5 мл) и смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 5 полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемой массой. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). COM472 (10 мг, 8,52 мкмоль) получали в виде белого твердого вещества.



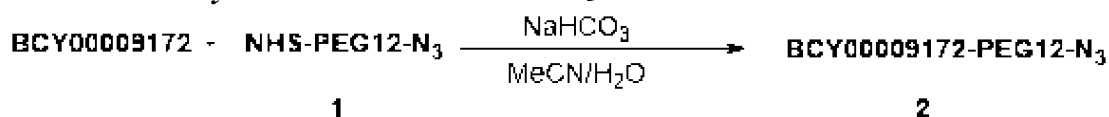
Смесь соединения 1 (300 мг, 449,96 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 2 (138 мг, 449,96 мкмоль, 1,0 экв.), HOBt (122 мг, 899,93 мкмоль, 2,0 экв.), EDCI (173 мг, 899,93 мкмоль, 2,0 экв) растворяли в DCM (10 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем смесь перемешивали при 20-25°C в течение 1 часа в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 955,06, наблюдаемое m/z: 955,3 ([M+H]⁺)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Смесь упаривали при пониженном давлении и получали соединение 3 (300 мг, неочищенное) в виде желтого масла.

Соединение 3 (300 мг, 314,12 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в DMF (4 мл), затем добавляли пиперидин (1 мл) и смесь перемешивали при 20-25°C в течение 1 часа. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 732,83, m/z: 733,2 ([M+H]⁺)). Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях). COM473 (160 мг, 218,33 мкмоль, выход 69,51%) получали в виде бесцветного масла.

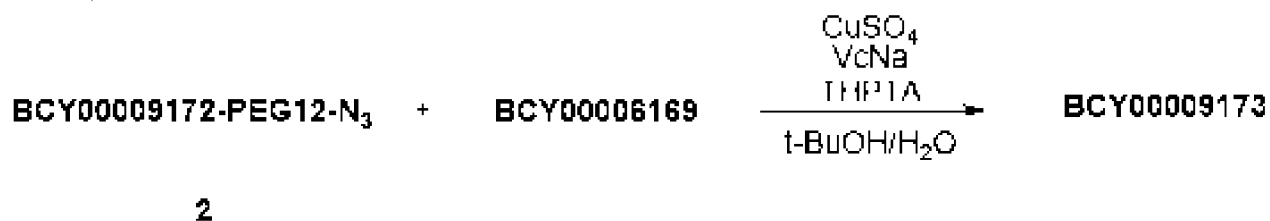
Пример 2: синтез связывающих EphA2/CD137 гетеротандемных

*бициклических пептидов***BCY9173**

BCY00009173

Методика получения BCY9172-PEG12-N₃

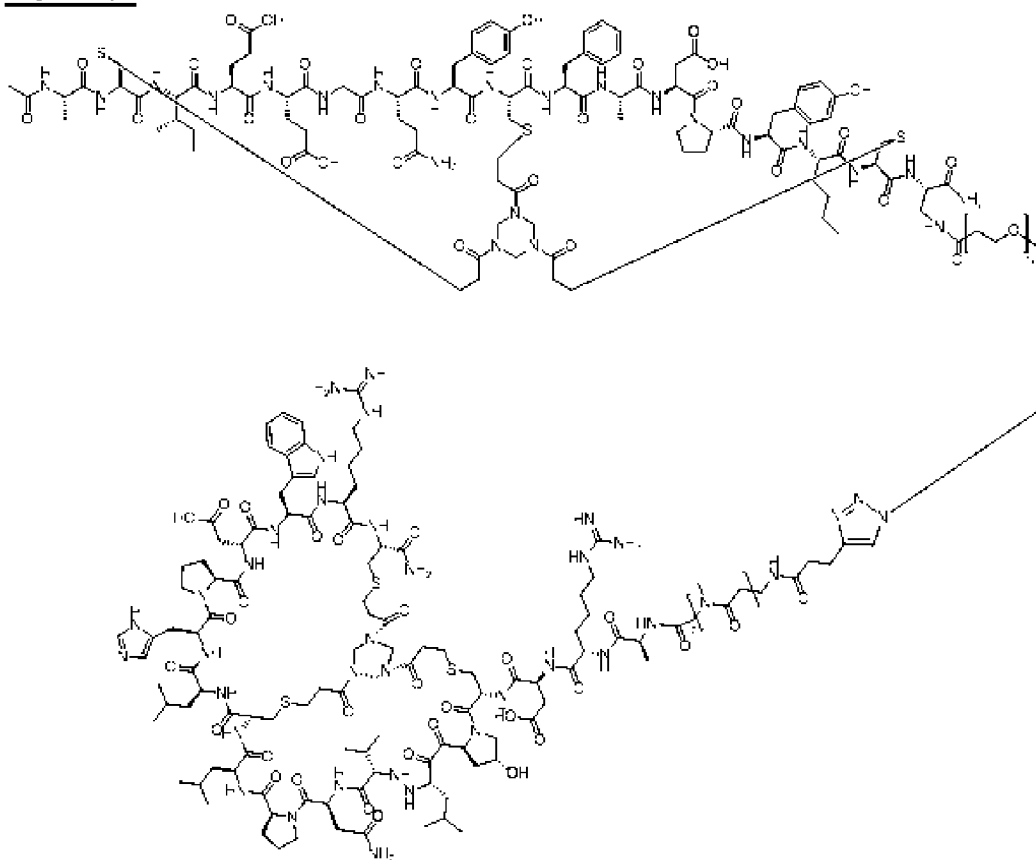
BCY9172 (520 мг, 248,16 мкмоль, 1 экв.) и соединение 1 (370 мг, 499,47 мкмоль, 2,01 экв.) растворяли в DMF (5 мл) и добавляли DIEA (48,11 мг, 372,24 мкмоль, 64,84 мл, 1,5 экв.), а затем смесь выдерживали при 30°C в течение 12 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BCY9172 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2721,12, наблюдаемое m/z: 1360,9 ([M/2+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали соединение 2 (284 мг, 101,10 мкмоль, выход 40,74%, чистота 96,87%) в виде белого твердого вещества.

***Методика получения BCY9173***

Эту реакцию проводили параллельно в двух независимых сосудах. В одном сосуде

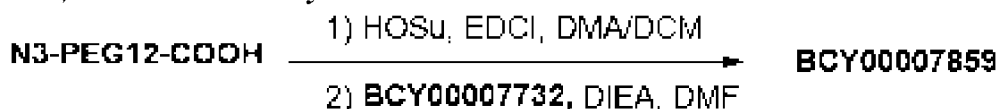
сначала растворяли соединение 2 (100 мг, 36,75 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY6169 (120 мг, 36,78 мкмоль, 1,0 экв.) в 10 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 91,9 мкл, 1,0 экв.), VcNa (аскорбат натрия, 0,4 М, 183,8 мкл, 2,0 экв.) и ТНРТА (трис-гидроксипропилтриазилилметиламин, 0,4 М, 91,9 мкл, 1,0 экв.). Наконец, добавляли 1 М NH₄НСО₃, чтобы довести рН до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 5983,85, наблюдаемое m/z: 997,6600 ([M/6+H]⁺) и 1197,2300 ([M/5+H]⁺). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали BCY9173 (218 мг, 34,97 мкмоль, выход 47,58%, чистота 96%) в виде белого твердого вещества.

BCY7985



BCY00007985

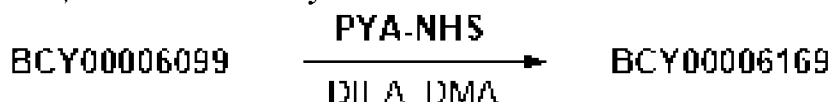
Общая методика получения BCY7859



К раствору N3-PEG12-COOH (250 мг, 388 мкмоль) и HOSu (N-гидроксисукцинимид, 67,0 г, 583 мкмоль) в DMA (N, N-диметилацетамид, 4,5 мл) и DCM (1,5 мл) добавляли EDCI (89,3 мг, 466 мкмоль) при перемешивании при 20°C в течение 16 часов. В другую круглую колбу объемом 50 мл, содержащую смесь BCY7732 (855 мг, 388

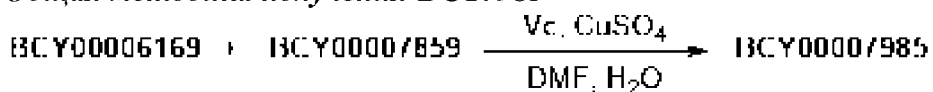
мкмоль) в 5 мл DMA, добавляли DIEA (186 мг, 1,44 ммоль, 250 мкл) при перемешивании в течение 10 мин. Затем в колбу добавляли исходную реакционную смесь с дальнейшим перемешиванием при 20°C в течение дополнительных 5 часов. ЖХ-МС анализ (ES8396-307-P1B1) показал, что BCY7732 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемой массой. Полученную реакционную смесь очищали напрямую с помощью препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), получая соединение BCY7859 (621 мг, 200 мкмоль, выход 51,6%, соль TFA) в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения BCY6169



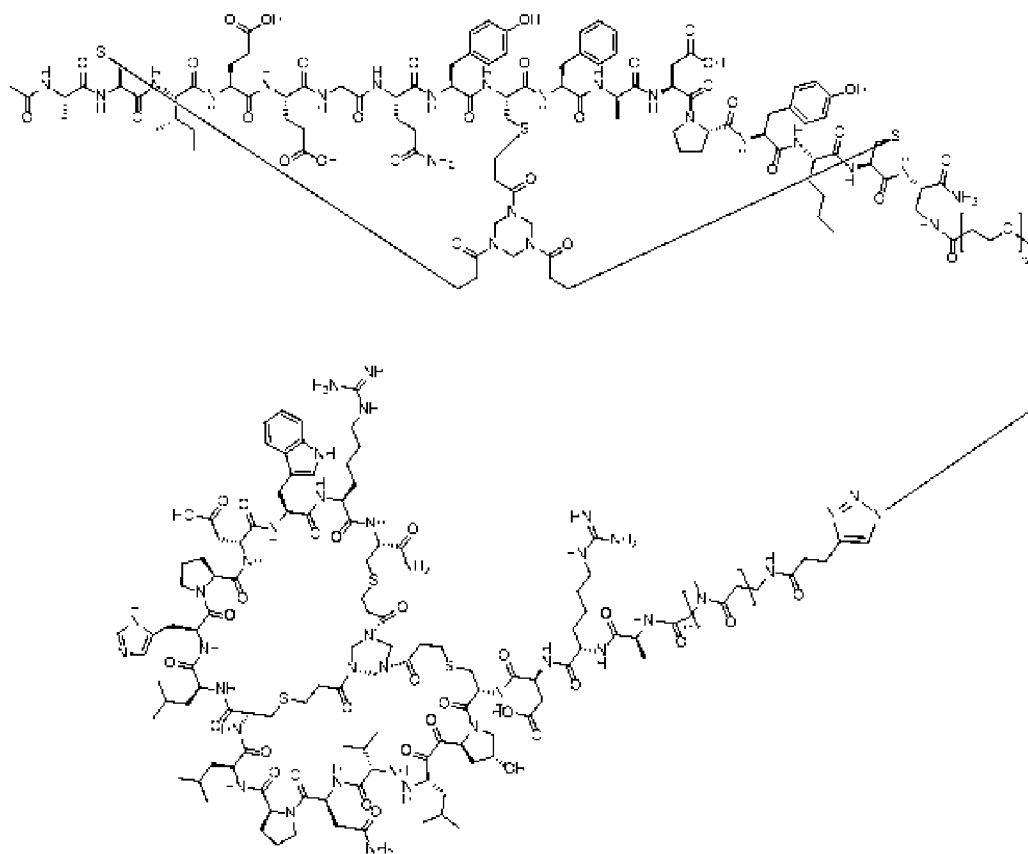
К раствору BCY6099 (300 мг, 94,3 мкмоль) в DMA (2 мл) добавляли DIEA (36,6 мг, 283 мкмоль, 49,3 мкл) при перемешивании в течение 10 мин. После этого добавляли PYA-NHS (36,8 мг, 189 мкмоль) с дальнейшим перемешиванием при 20°C в течение дополнительных 15 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BCY6099 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемой массой. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях), получая соединение BCY6169 (299 мг, 86,2 мкмоль, выход 91,5%) в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения BCY7985

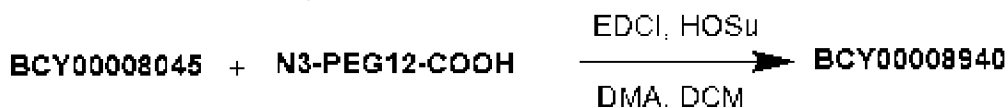


К раствору BCY7859 (220 мг, 77,8 мкмоль) и BCY6169 (251 мг, 77,1 мкмоль) в DMF (5 мл), продутого азотом в течение 2 часов, добавляли водный раствор аскорбиновой кислоты (Vc, 0,8 М, 963 мкл) с последующим добавлением водного раствора CuSO₄ (0,8 М, 289 мкл) в атмосфере азота. Затем смесь перемешивали при 20°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BCY6169 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемой массой. Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), получая соединение BCY7985 (283 мг, 43,4 мкмоль, выход 56,3%, TFA) в виде белого твердого вещества.

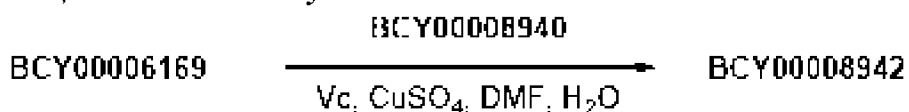
BCY8942



BCY00008942

Общая методика получения BCY8940

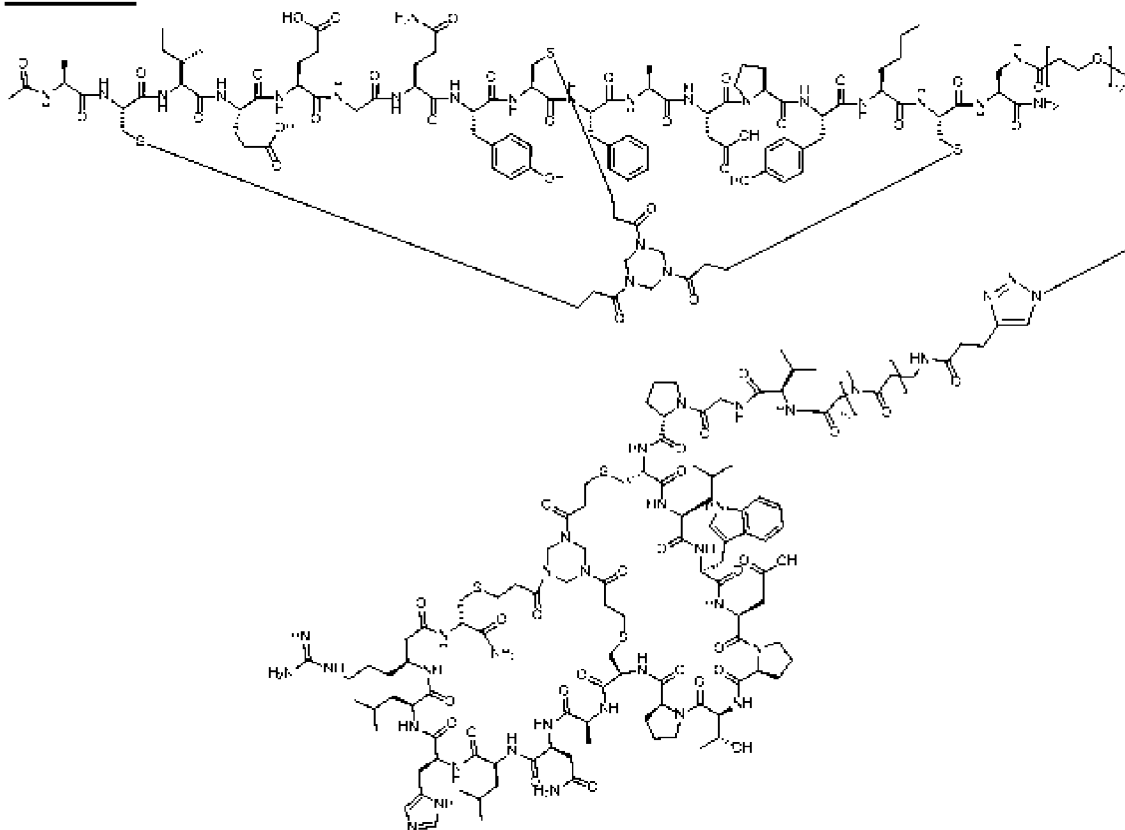
К раствору N3-PEG12-COOH (120 мг, 186 мкмоль, 1,0 экв.) в DMA (3 мл) и DCM (1 мл) при перемешивании добавляли HOSu (32,2 г, 280 мкмоль, 1,5 экв.). Затем к смеси добавляли EDCI (42,9 мг, 224 мкмоль, 1,2 экв.) при дальнейшем перемешивании в течение дополнительных 7 часов при 20°C. ЖХ-МС анализ показал, что активированный сложный эфир образовался полностью. В другую колбу с BCY8045 (410 мг, 186 мкмоль, 1,0 экв.) в DMA (3 мл) добавляли DIEA (120 мг, 932 мкмоль, 162 мл, 5,0 экв.) при перемешивании, затем добавляли активированный сложный эфир и смесь перемешивали 18 часов при 20°C. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один основной пик с желаемым m/z. Реакционную смесь концентрировали в вакууме для удаления DCM. Полученную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), получая BCY8940 (190 мг, 67,2 мкмоль, выход 36,1%) в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения BCY8942

К раствору BCY8940 (28,6 мг, 10,1 мкмоль, 1,1 экв.) и BCY6169 (30,0 мг, 9,19

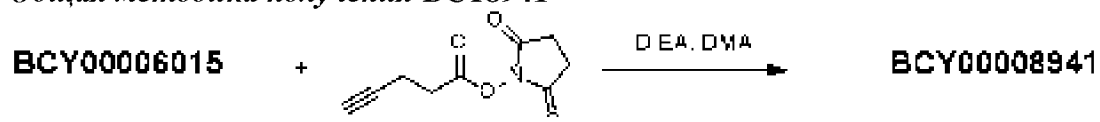
мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (2,0 мл) добавляли (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-он (1,0 M, 92,0 мл) и CuSO₄ (1,0 M, 27,6 мл) при перемешивании в атмосфере азота в течение 2 часов при 20°C. ЖХ-МС анализ показал, что ВСУ6169 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 6089,91, наблюдаемое m/z: 1218,4 ([M/5+H]⁺), 1016,0 ([M/6+H]⁺), 870,7 ([M/7+H]⁺). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), получая соединение ВСУ8942 (15,4 мг, 2,46 мкмоль, выход 26,8%, чистота 97,3%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ8943



ВСУ00008943

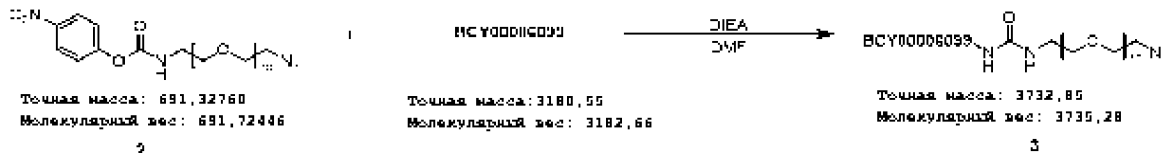
Общая методика получения ВСУ8941



К раствору ВСУ6015 (пептида, идентичного ВСУ8941, за исключением отсутствия фрагмента PUA; 100 мг, 32,9 мкмоль) в DMA (2 мл) добавляли DIEA (12,8 мг, 98,7 мкмоль, 17,2 мл) при перемешивании в течение 10 мин. Затем к смеси добавляли (2,5-диоксопирролидин-1-ил)пент-4-иноат (12,8 мг, 65,8 мкмоль) с последующим перемешиванием при 20°C в течение 16 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 3119,60, наблюдаемое m/z: 1040,5 ([M/3+H]⁺). Смесь очищали с

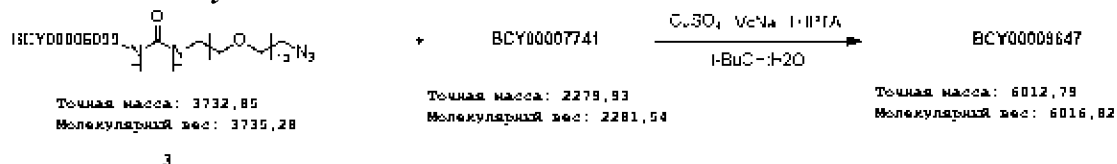
К раствору COM134 (30,0 мг, 57,0 мкмоль, 1,0 экв.) соединение 1 (17,2 мг, 85,3 мкмоль, 1,5 экв.) в DCM (0,5 мл) добавляли TEA (8,65 мг, 11,9 мл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХ-МС анализ показал, что COM134 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемой массой (расчетный MW: 691,72, наблюдаемое m/z: 692,3 ([M+H]⁺) и 709,3 ([M+NH₄]⁺)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, а затем лиофилизировали, получая неочищенное соединение 2 (30,5 мг, неочищенное) в виде белого вещества.

Методика получения соединения 3



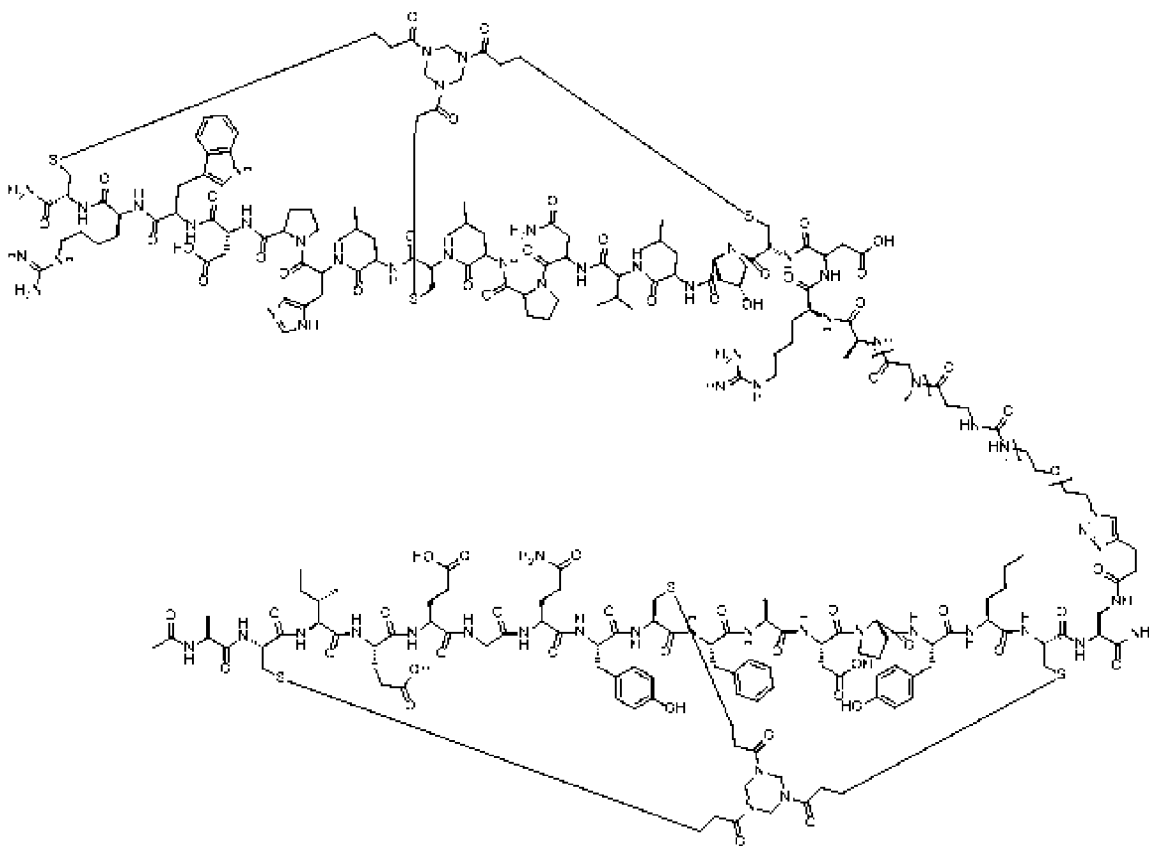
К раствору соединения 2 (10 мг, 1,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли ВСУ6099 (46 мг, 1,0 экв.) и DIEA (5,61 мг, 7,55 мкл, 3,0 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 3735,28, наблюдаемое m/z: 1245,9 ([M/3+H]⁺) и 934,5 ([M/4+H]⁺)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (34 мг, 62,96% выход, 100% чистота) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ9647

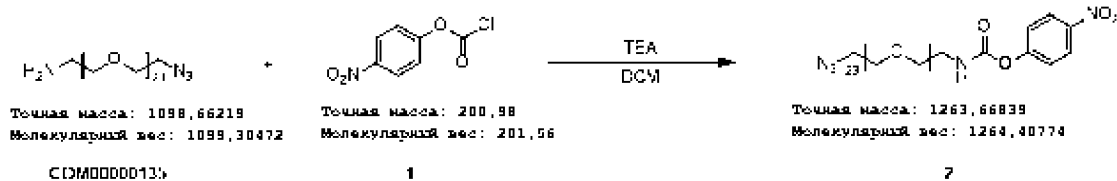


Смесь соединения 3 (34 мг, 9,10 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ7741 (23 мг, 10,08 мкмоль, 1,11 экв.) и ТНРТА (0,4 М, 11,4 мл, 0,5 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом 3 раза), а затем под N₂ добавляли CuSO₄ (0,4 М, 11,4 мкл, 0,5 экв.) и VcNa (0,4 М, 22,8 мкл, 1 экв.). pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 6016,82, наблюдаемое m/z: 1204,1 ([M/5+H]⁺), 1003,5 ([M/6+H]⁺), 860,3 ([M/7+H]⁺)). Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ9647 (31,2 мг, выход 54,67%, чистота 95,96%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ9648

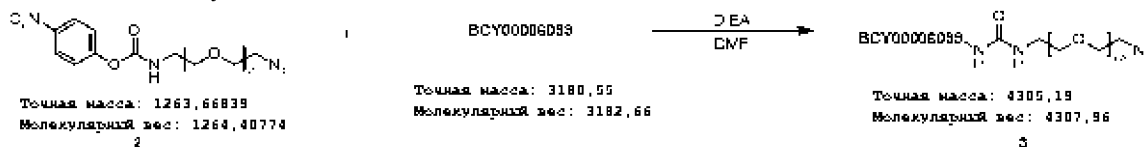


Методика получения соединения 2



К раствору COM135 (30 мг, 27,29 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 1 (8,25 мг, 40,94 мкмоль, 1,5 экв.) в DCM (0,5 мл) добавляли TEA (4,14 мг, 40,94 мкмоль, 5,70 мл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 25~30°C в течение 1 часа. ЖХ-МС анализ показал, что COM135 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемой массой [расчетный MW: 1264,41, наблюдаемое m/z : 1281,4 ($[M+NH_4]^+$), 649,8 ($[M/2+H]^+$)]. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), получая соединение 2 (18 мг, 14,2 мкмоль, выход 52,14%).

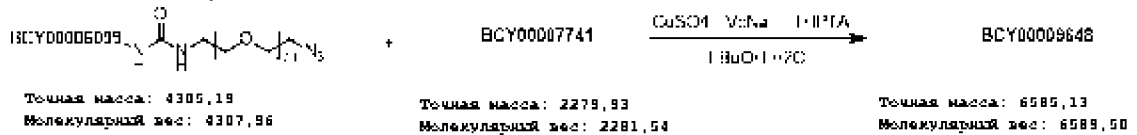
Методика получения соединения 3



К раствору соединения 3 (9 мг, 7,12 мкмоль, 1 экв.) в DMF (1 мл) добавляли BCY0099 (23 мг, 7,23 мкмоль, 1,02 экв.) и DIEA (2,76 мг, 21,35 мкмоль, 3,72 мкл, 3,0 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z

(расчетный MW: 4307,96, наблюдаемое m/z: 1436,9 ($[[M/3+H]^+$), 1077,9 ($[[M/4+H]^+$), 862,5 ($[[M/5+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (14,6 мг, выход 47,61%, чистота 100%) получали в виде белого твердого вещества.

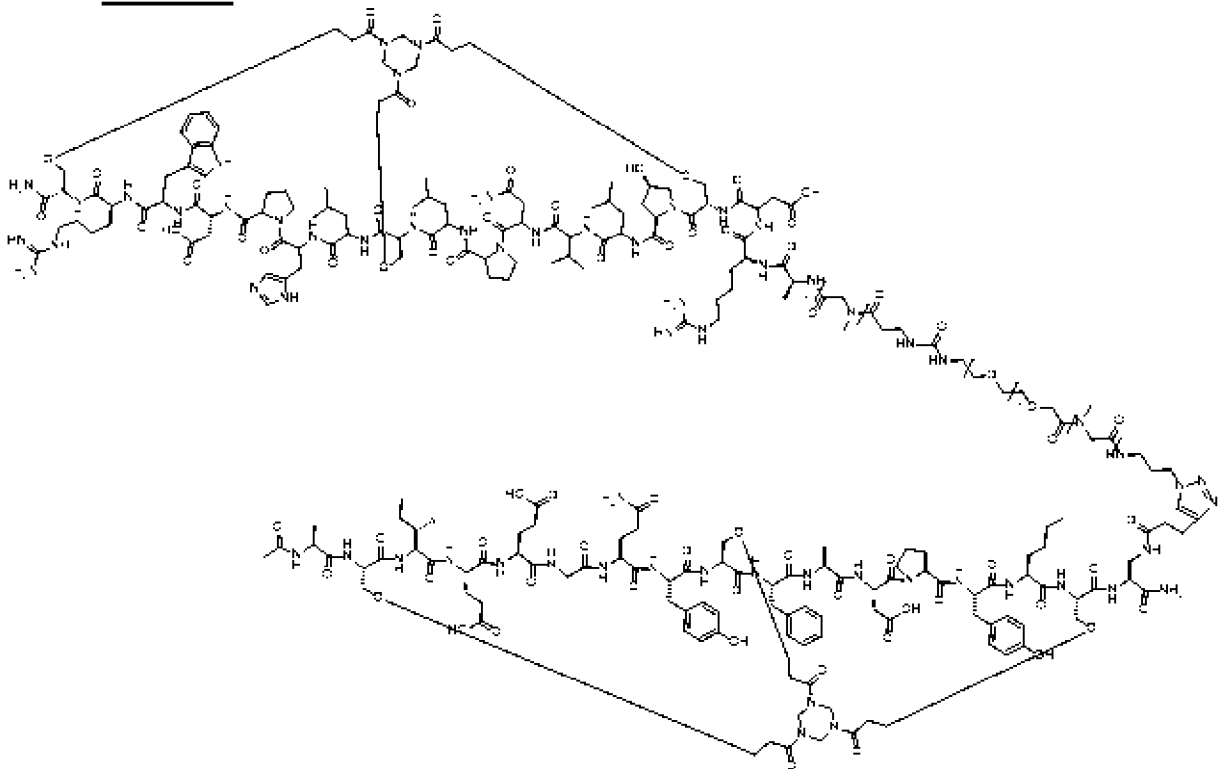
Методика получения ВСУ9648



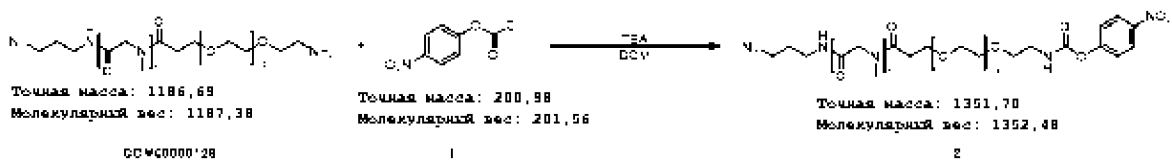
3

Смесь соединения 3 (14,6 мг, 3,39 мкмоль, 1 экв.), ВСУ7741 (8,5 мг, 3,73 мкмоль, 1,1 экв.) и THPTA (0,4 М, 4,3 мкл, 0,5 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 4,3 мкл, 0,5 экв.) и VcNa (0,4 М, 8,6 мкл, 1,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым m/z (MW: 6589,50, наблюдаемое m/z: 1098,8 ($[[M/6+H]^+$), 942,1 ($[[M/7+H]^+$), 824,6 ($[[M/8+H]^+$)). Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ9648 (14,7 мг, выход 63,34%, чистота 96,22%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ9655

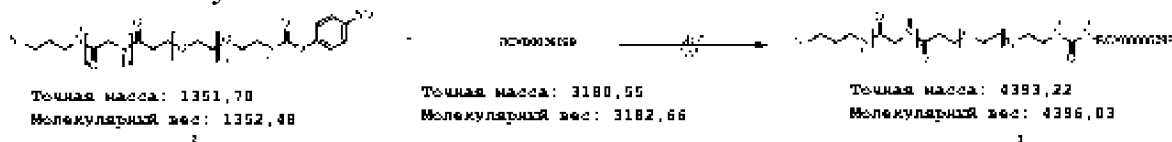


Методика получения соединения 2



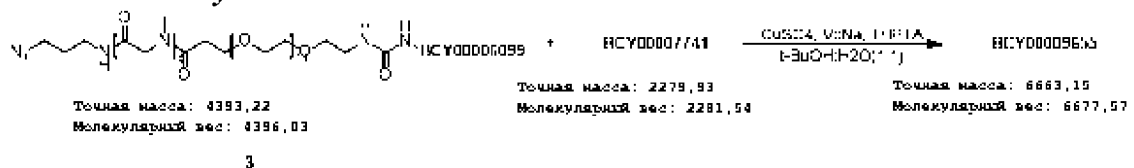
К раствору COM128 (120 мг, 101,06 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 1 (25 мг, 124,03 мкмоль, 1,25 экв.) в DCM (0,5 мл) добавляли TEA (15,34 мг, 151,59 мкмоль, 21,10 мкл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один новый пик с желаемым m/z (расчетный MW: 1352,48, наблюдаемое m/z : 676,8 ($[M/2+H]^+$), 1369,3 ($[M+NH_4]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях). Соединение 2 (14 мг, 8,99 мкмоль, выход 8,90%, чистота 86,86%) получали в виде бесцветного масла.

Методика получения соединения 3



К раствору соединения 2 (7 мг, 5,18 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY6099 (16 мг, 5,03 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (2 мл) добавляли DIEA (2,01 мг, 15,53 мкмоль, 2,70 мкл). Смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 4396,02, наблюдаемое m/z : 879,8 ($[M/5+H]^+$) и 1099,8 ($[M/4+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии 0,1% TFA). Соединение 3 (11,8 мг, выход 48,29%, чистота 93,1 %) получали в виде белого твердого вещества.

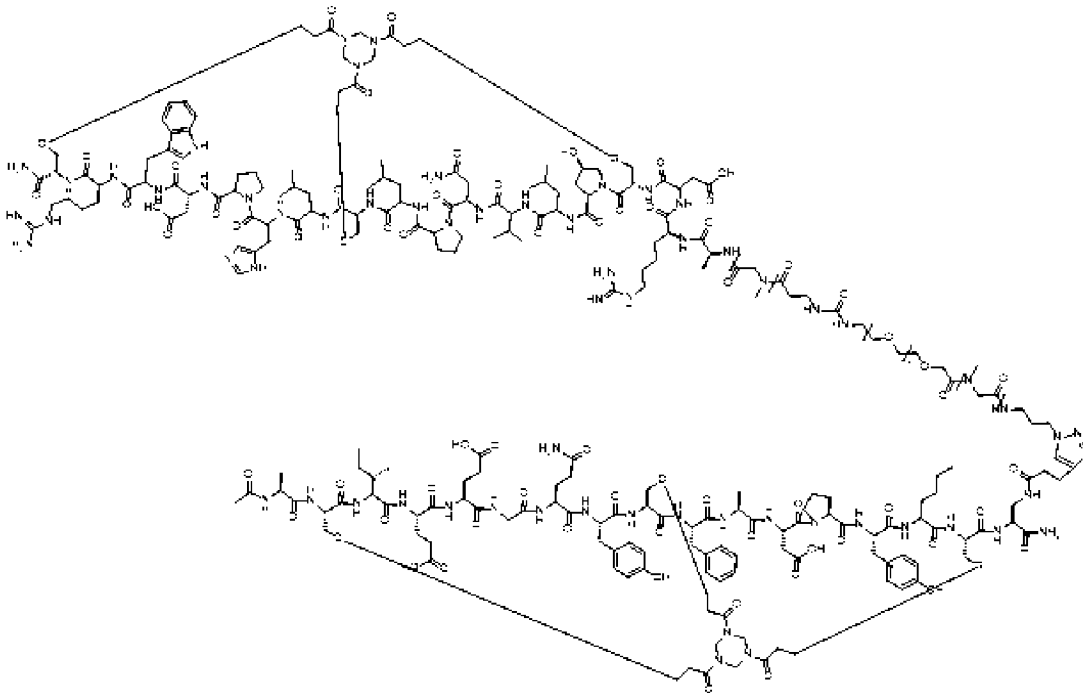
Методика получения BCY9655



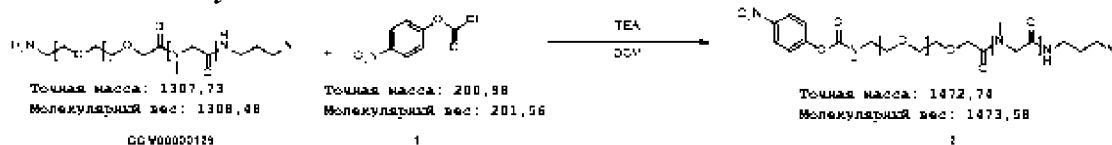
Смесь соединения 3 (11,8 мг, 2,69 мкмоль, 1,0 экв.), BCY7741 (7,0 мг, 3,07 мкмоль, 1,14 экв.) и THPTA (0,4 М, 6,8 мкл, 1 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 6,8 мл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 13,6 мл, 2,0 экв.) под N₂. pH этого раствора доводили до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 6677,57, наблюдаемое m/z : 1113,7 ($[M/6+H]^+$), 954,7 ($[M/7+H]^+$)). Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). BCY9655 (1,9 мг, 0,26 мкмоль,

выход 9,65%, чистота 91,15%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY9656

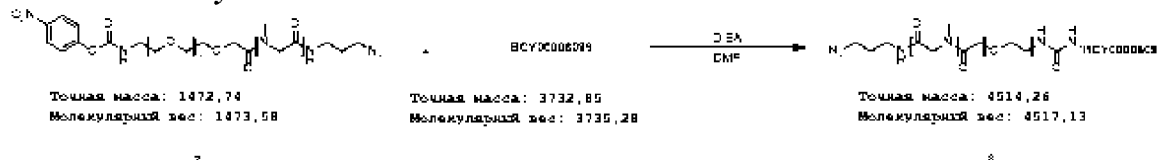


Методика получения соединения 2



К раствору COM129 (30,0 мг, 22,93 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 1 (6,9 мг, 34,39 мкмоль, 1,5 экв.) в DCM (3 мл) добавляли TEA (3,5 мг, 34,39 мкмоль, 4,8 мкл, 1,5 экв.). Смесь дегазировали и продували N₂ 3 раза, а затем смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что COM129 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 1473,58, наблюдаемое m/z: 737,3 ([M/2+H]⁺)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях), получая соединение 2 (12,3 мг, 8,35 мкмоль, выход 36,41%) в виде белого твердого вещества.

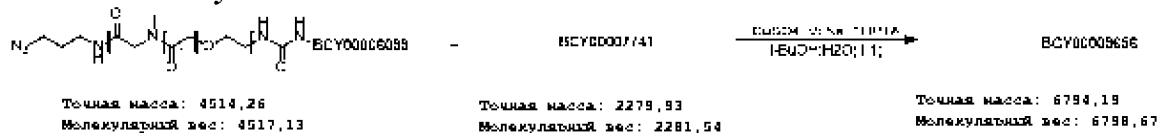
Методика получения соединения 3



К раствору соединения 2 (9,26 мг, 6,28 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY6099 (10 мг, 3,14 мкмоль, 0,5 экв.) в DMF (3 мл) добавляли TEA (0,7 мг, 6,93 мкмоль, 1 мкл, 1,1 экв.). Смесь дегазировали и продували N₂ 3 раза, а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 часа в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW:

4517,12, наблюдаемое m/z : 1129,8 $[M/4+H]^+$, 904,1 $([M/5+H]^+)$, 753,7 $([M/6+H]^+)$). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (12 мг, выход 72,36%, чистота 85,58%) получали в виде белого твердого вещества.

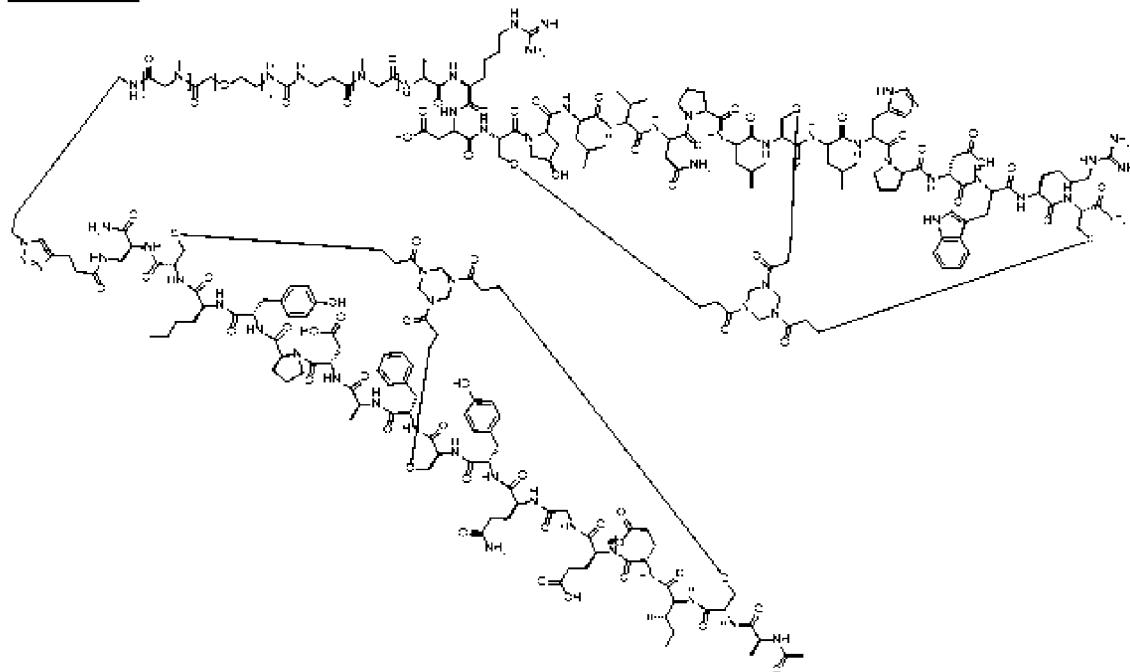
Методика получения ВСУ9656



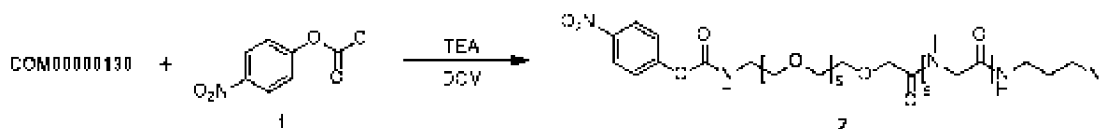
3

Смесь соединения 3 (11 мг, 2,44 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ7741 (6,0 мг, 2,63 мкмоль, 1,08 экв.) и ТНРТА (0,4 М, 6,1 мкл, 1,0 экв.) растворяли в t -BuOH/ H_2O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), а затем добавляли $CuSO_4$ (0,4 М, 6,1 мл, 1,0 экв.) и $VcNa$ (0,4 М, 12,2 мл, 2,0 экв.) под в атмосфере N_2 . pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH_4HCO_3 (в соотношении 1:1 с t -BuOH/ H_2O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 6798,66, наблюдаемое m/z : 1133,8 $([M/6+H]^+)$, 971,9 $([M/7+H]^+)$, 850,7 $([M/8+H]^+)$). Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ9656 (6,8 мг, выход 37,36%, чистота 90,97%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ9657

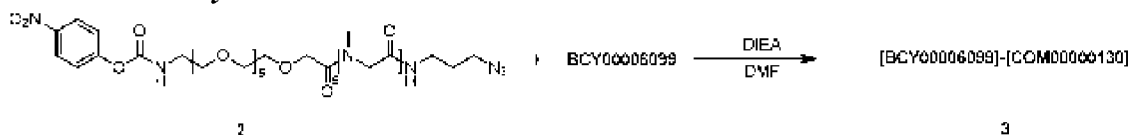


Методика получения соединения 2



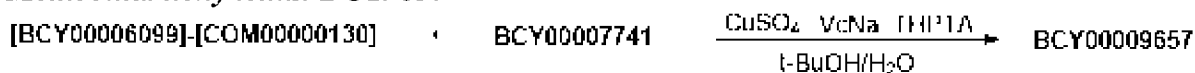
К раствору COM130 (30,0 мг, 20,78 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 1 (6,3 мг, 31,17 мкмоль, 1,5 экв.) в DCM (3 мл) добавляли TEA (3,2 мг, 31,17 мкмоль, 4,4 мкл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 часа. ЖХ-МС анализ показал, что COM130 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 1608,7, наблюдаемое m/z : 804,8 ($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и лиофилизировали, получая соединение 2 (7,9 мг, неочищенное) в виде белого твердого вещества.

Методика получения соединения 3



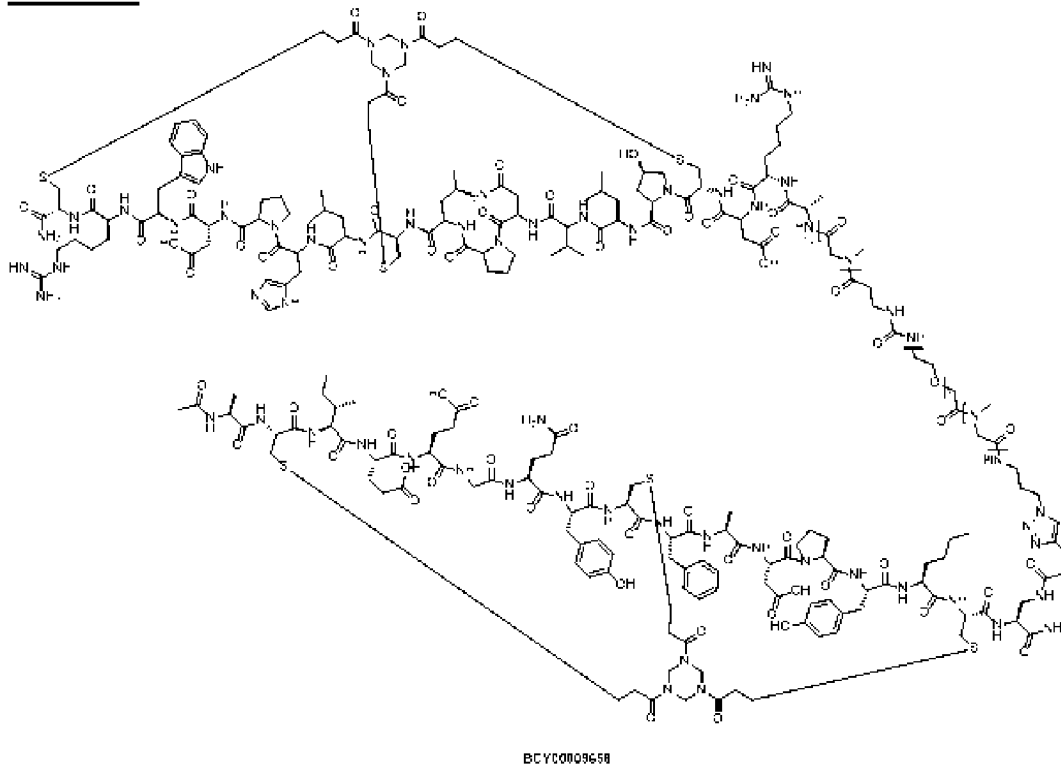
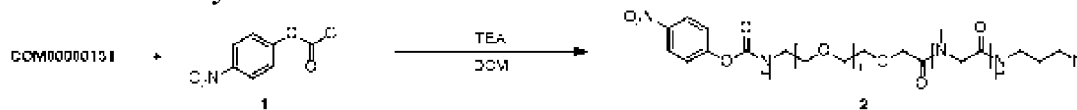
К раствору соединения 2 (7,9 мг, 4,91 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY6099 (16 мг, 5,03 мкмоль, 1,02 экв.) в DMF (1 мл) добавляли DIEA (1,9 мг, 14,73 мкмоль, 2,6 мкл, 3,0 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 4652,25, наблюдаемое m/z : 1551,3 ($[M/3+H]^+$), 1163,6 ($[M/4]^+$), 931,1 ($[M/5+H]^+$), 776,1 ($[M/6+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (13,3 мг, 2,86 мкмоль, выход 53,22%, чистота 91,42%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY9657

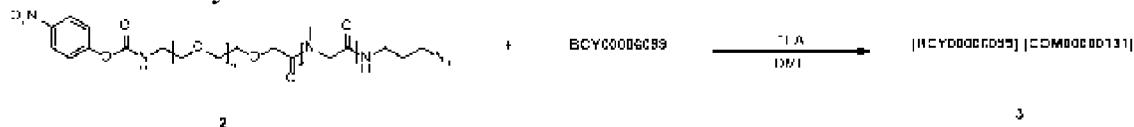


3

Смесь соединения 3 (13,3 мг, 2,86 мкмоль, 1,0 экв.), BCY7741 (7,0 мг, 3,07 мкмоль, 1,03 экв.) и ТНРТА (0,4 М, 7,5 мкл, 1,0 экв.) растворяли в t -BuOH/ H_2O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), а затем добавляли $CuSO_4$ (0,4 М, 7,5 мкл, 1 экв.) и VcNa (0,4 М, 15 мкл, 2,0 экв.) в атмосфере N_2 . pH этого раствора доводили до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH_4HCO_3 (в соотношении 1:1 с t -BuOH/ H_2O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [MW: 6933,78, наблюдаемое m/z : 1156,7 ($[M/6+H]^+$), 991,4 ($[M/7+H]^+$), 867,4 ($[M/8+H]^+$)]. Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). BCY9657 (8,4 мг, выход 40,21%, чистота 94,9%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY9658**Методика получения соединения 2**

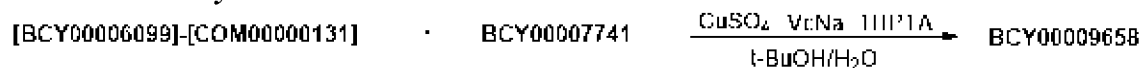
К раствору COM131 (167,0 мг, 227,89 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 1 (55,0 мг, 272,87 мкмоль, 1,2 экв.) в DCM (5 мл) добавляли TEA (36,4 мг, 359,23 мкмоль, 50,0 мкл, 1,6 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 часа. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 897,93, наблюдаемый 920,3 ($[M+Na]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (35 мг, 33,74 мкмоль, выход 14,81%, чистота 86,56%) получали в виде бесцветного масла.

Методика получения соединения 3

К раствору соединения 2 (15 мг, 16,71 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY6099 (53 мг, 16,65 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (2 мл) добавляли DIEA (6,48 мг, 65,05 мкмоль, 50,1 мкл, 4,0 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 3941,47, наблюдаемое m/z : 986,0 ($[M/4+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). [BCY6099]-[COM131] (5 мг,

выход 50,48%, чистота 94,96%) получали в виде белого твердого вещества.

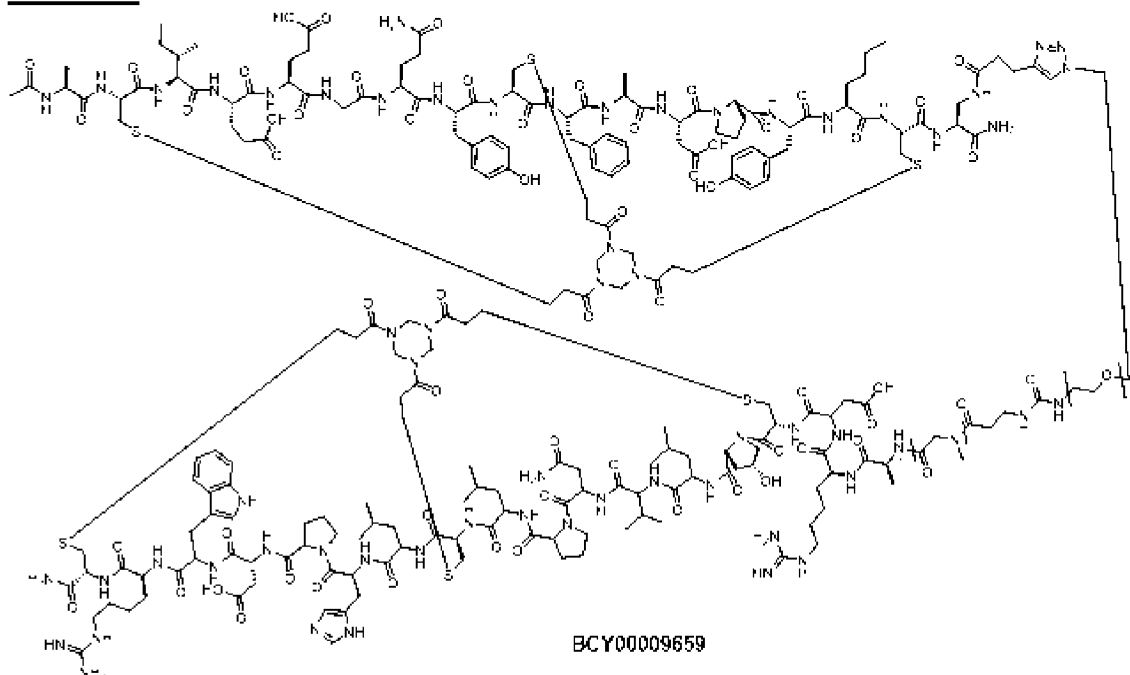
Методика получения ВСУ9658



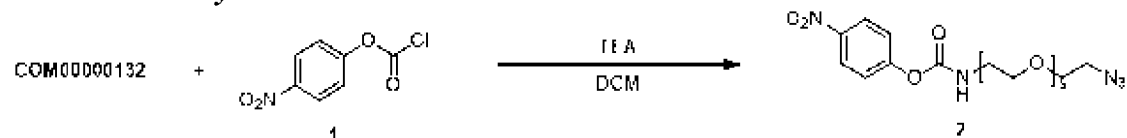
3

Смесь соединения 3 (35 мг, 8,88 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ7741 (21 мг, 9,20 мкмоль, 1,03 экв.) и ТНРТА (0,4 М, 22,2 мкл, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 22,2 мл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 44,4 мл, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [MW: 6223,01 наблюдаемое m/z: 1038,0 ([M/6+H]⁺) и 889,8 ([M/8+H]⁺)]. Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ9658 (13,2 мг, выход 21,54%, чистота 90,16%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ9659



Методика получения соединения 2



К раствору COM132 (20,0 мг, 65,28 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 1 (15,8 мг, 78,34 мкмоль, 1,2 экв.) в DCM (5 мл) добавляли TEA (36,4 мг, 359,23 мкмоль, 50 мл, 5,5 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. С помощью ЖХ-МС анализа был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 471,46, наблюдаемое m/z: 489,2

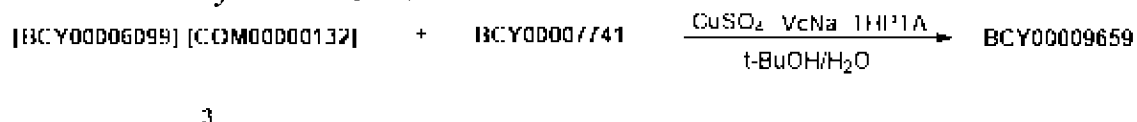
($[M+NH_4]^+$). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, получая соединение 2 (26 мг, неочищенное) в виде бесцветного масла.

Методика получения соединения 3



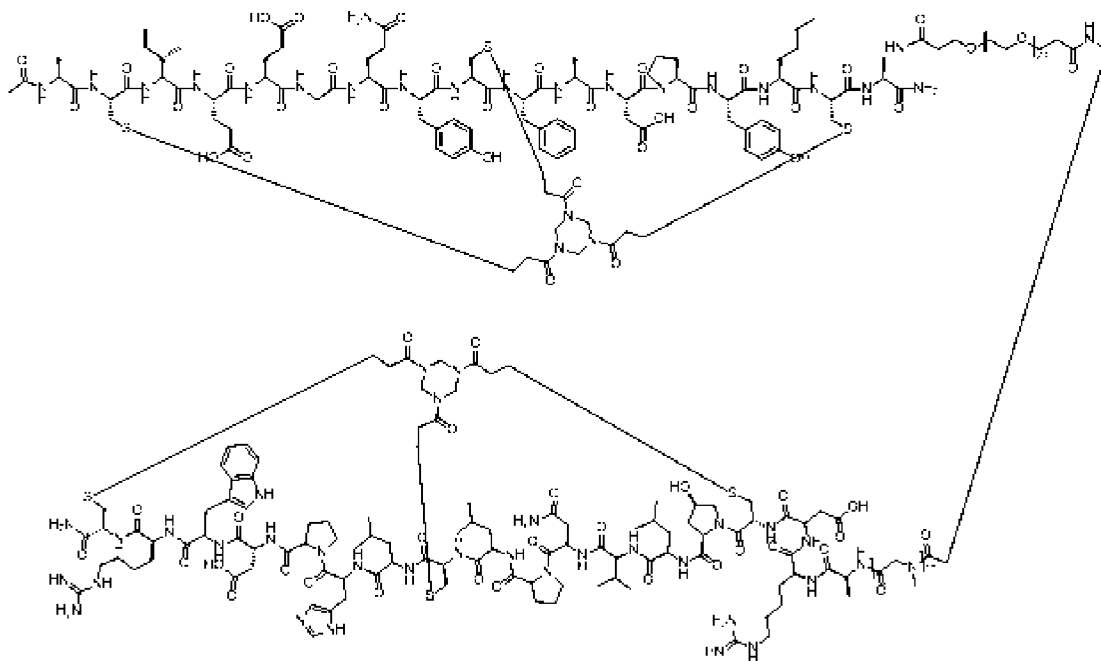
К раствору соединения 2 (15,0 мг, 4,71 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY6099 (3,33 мг, 7,07 мкмоль, 1,5 экв.) в DMF (3 мл) добавляли TEA (0,7 мг, 6,93 мкмоль, 1 мл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 3515,01, наблюдаемое m/z : 1172,1 ($[M/3+H]^+$) 879,5 ($[M/4+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (12,7 мг, 3,26 мкмоль, выход 69,23%, чистота 90,3%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY9659

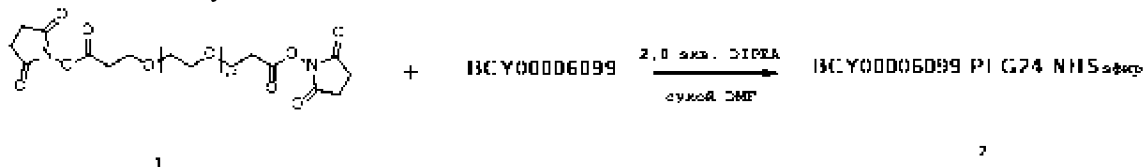


Смесь соединения 3 (12,7 мг, 2,89 мкмоль, 1,0 экв.), BCY7741 (6,80 мг, 2,98 мкмоль, 1,03 экв.) и THPTA (1,3 мг, 2,99 мкмоль, 1,03 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 7,3 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 14,6 мкл, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [MW: 5796,54 наблюдаемое m/z : 1159,8 ($[M/5+H]$), 966,7 ($[M/6+H]^+$)]. Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). BCY9659 (6,2 мг, 1,06 мкмоль, выход 36,58%, чистота 98,86%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY9758

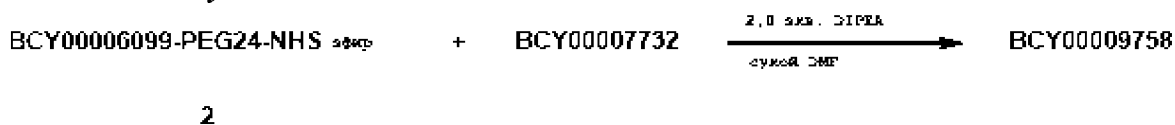


Методика получения соединения 2



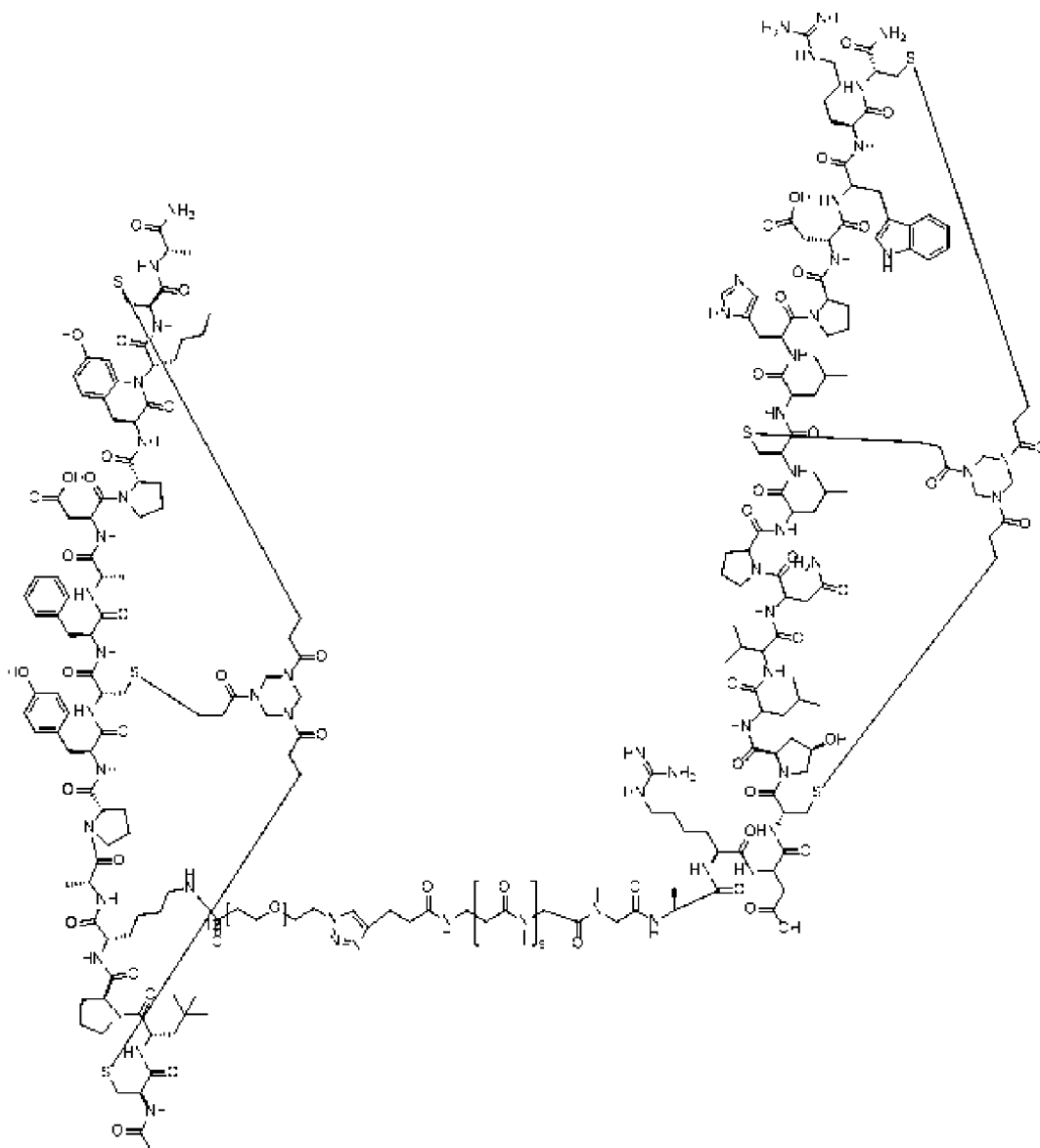
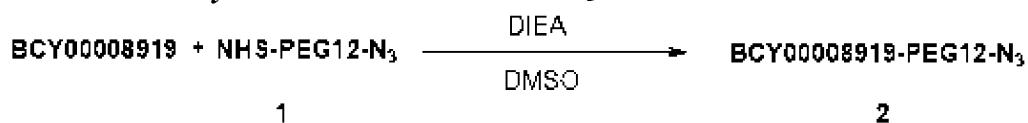
К раствору соединения 1 (5,0 мг, 3,54 мкмоль, 1,0 экв.), BSY6099 (11,3 мг, 3,54 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (3 мл) добавляли DIEA (0,9 мг, 7,07 мкмоль, 1,2 мкл, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 20 минут. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один пик с желаемым m/z (MW: 4481,11, наблюдаемое m/z : 1101,3 ($[M/4+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, и лиофилизировали, получая соединение 2 (15 мг, неочищенное) в виде белого твердого вещества.

Методика получения BSY9758



К раствору соединения 2 (15 мг, 3,35 мкмоль, 1,0 экв.) и BSY7732 (14,74 мг, 6,69 мкмоль, 2,0 экв.) в DMF (3 мл) добавляли DIEA (0,9 мг, 7,07 мкмоль, 1,2 мкл, 2,1 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 6567,48, наблюдаемое m/z : 1095,1 ($[M/6+H]$), 938,8 ($[M/7+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). BSY9758 (5,8 мг, выход 24,26%, чистота 91,97%) получали в виде белого твердого вещества.

BSY10568

**BCY00010568****Методика получения BCY8919-PEG12-N₃**

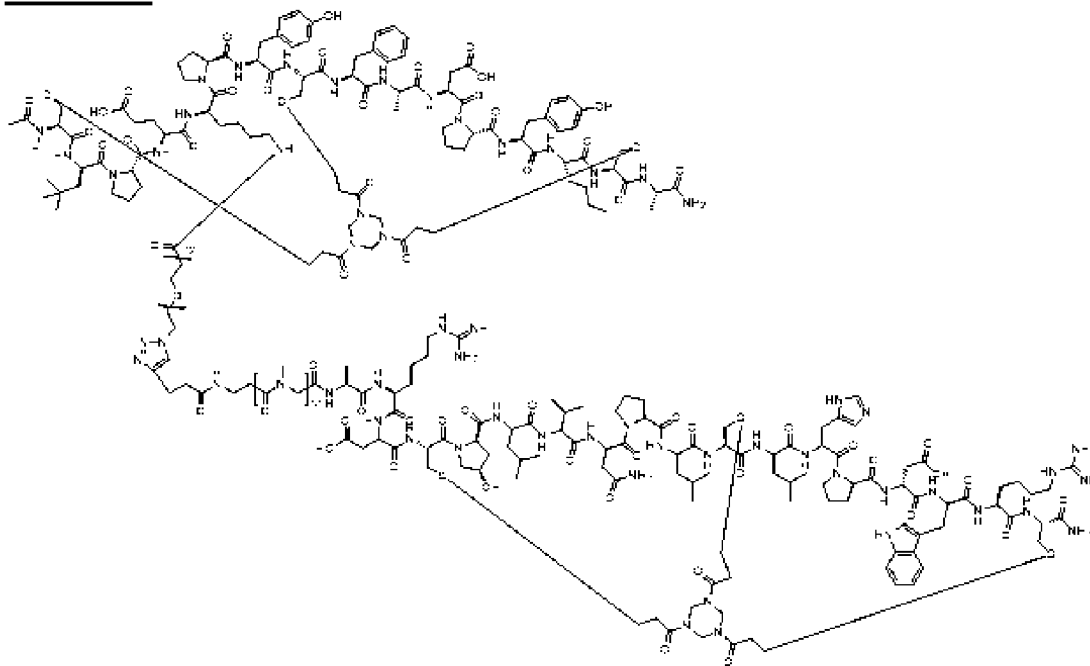
BCY8919 (80,0 мг, 38,47 мкмоль, 1,0 экв.) и соединение 1 (29,6 мг, 40,01 мкмоль, 1,04 экв.) растворяли в DMSO (1 мл). Затем к раствору добавляли DIEA (7,46 мг, 55,71 мкмоль, 10,0 мкл, 1,5 экв.), а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что большая часть BCY8919 была израсходована, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2705,16, наблюдаемое m/z: 1353,1 ([M/2+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), и соединение 2 (18,6 мг, 6,86 мкмоль, выход 17,83%, чистота 99,76%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY10568

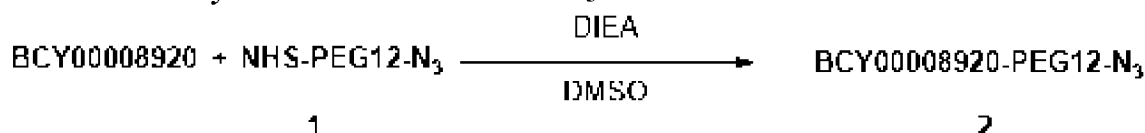


2

Соединение 2 (9,0 мг, 3,33 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY6169 (11,0 мг, 3,36 мкмоль, 1,01 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 8,3 мкл, 1,0 экв.), VcNa (1,4 мг, 7,06 мкмоль, 2,1 экв.) и THPTA (1,4 мг, 3,22 мкмоль, 1,0 экв.). Наконец, добавляли 0,4 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 5967,90, наблюдаемое m/z: 995,00 ([M/5+H]⁺) и 1194,70 ([M/6+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали BCY10568 (13,4 мг, 2,16 мкмоль, выход 69,44%, чистота 96,3%) в виде белого твердого вещества.

BCY10570

BCY00010570

Методика получения BCY8920-PEG12-N₃

К раствору BCY8920 (37 мг, 17,31 мкмоль, 1,0 экв.) и соединения 1 (15 мг, 20,25 мкмоль, 1,2 экв.) в DMSO (2 мл) добавляли DIEA (3,36 мг, 25,96 мкмоль, 4,5 мл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 12 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BCY8920 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z

(расчетный MW: 2763,2, наблюдаемое m/z: 689,07 ([M/4-H⁺])). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя и получали остаток. Затем остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях). Соединение 2 (22,8 мг, 8,15 мкмоль, выход 47,09%, чистота 98,78%) получали в виде белого твердого вещества.

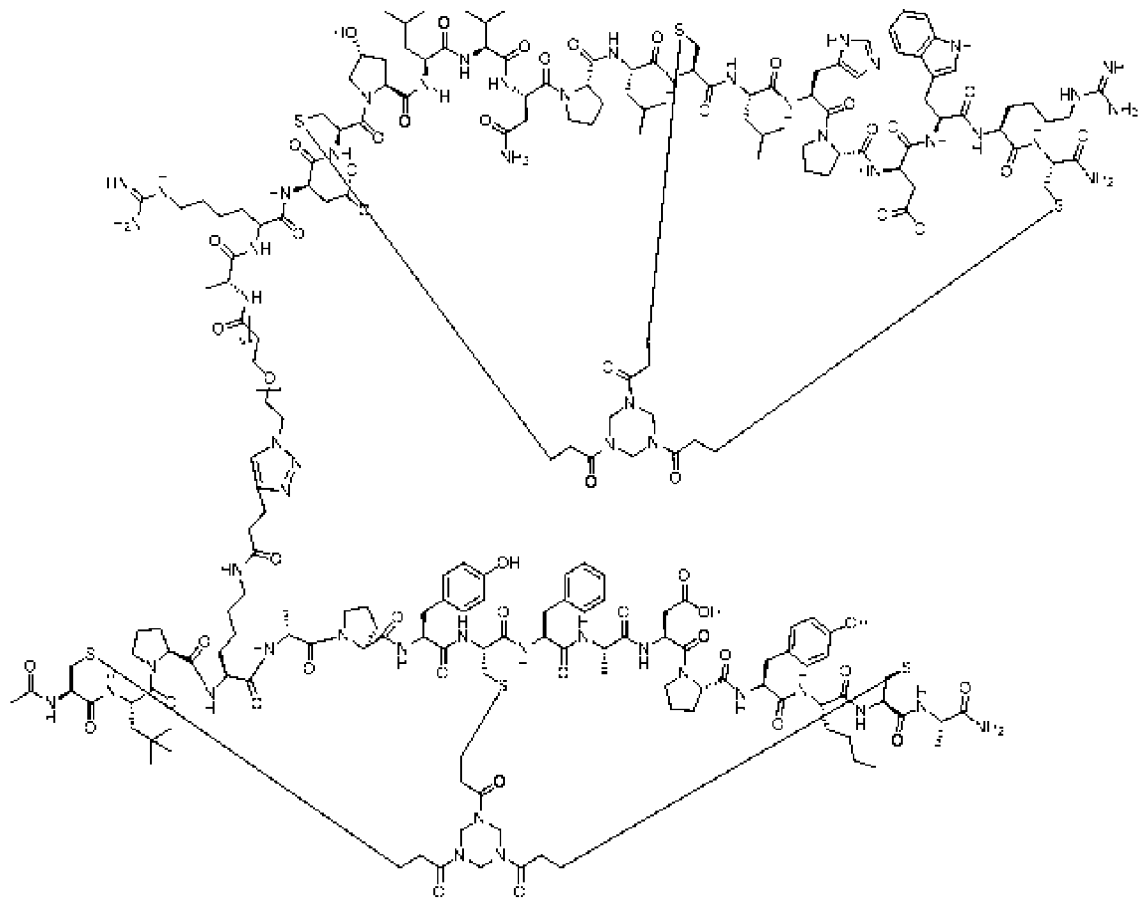
Методика получения ВСУ10570



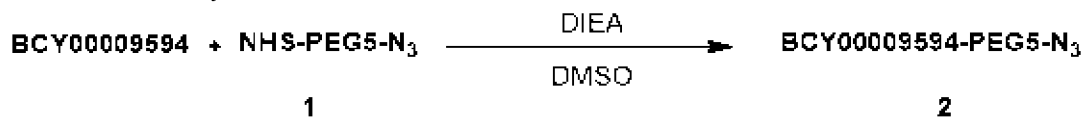
2

Соединение 2 (6 мг, 2,17 мкмоль, 1,0 экв.) и ВСУ6169 (7,08 мг, 2,17 мкмоль, 1,0 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 5,4 мл, 1,0 экв.), VcNa (0,4 М, 10,8 мкл, 2,0 экв.) и THPTA (0,4 М, 5,4 мкл, 1,0 экв.). Наконец добавляли 0,2 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 4 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MS: 6025,93, наблюдаемое m/z: 1004,56 ([M/6]+H⁺) и 861,48 ([M/7+H⁺])). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ10570 (7,2 мг, 1,17 мкмоль, выход 53,90%, чистота 97,95%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ10574

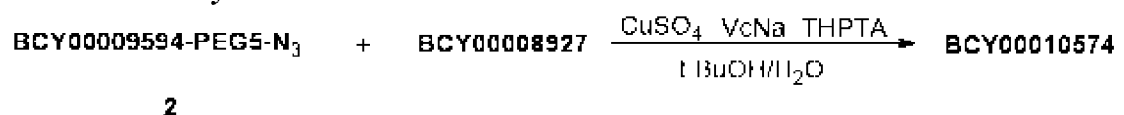


Методика получения соединения 2



К раствору BCY9594 (65 мг, 27,07 мкмоль, 1 экв.), соединения 1 (12,00 мг, 27,75 мкмоль, 1,02 экв.) в DMSO (1 мл) добавляли DIEA (5,25 мг, 40,61 мкмоль, 7,07 мИ, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BCY9594 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2718,13, наблюдаемое m/z: 906,04 ([M/3+H]⁺), 1359,07 ([M/2+H]⁺). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (42,6 мг, 15,67 мкмоль, выход 57,89%, чистота 100%) получали в виде белого твердого вещества.

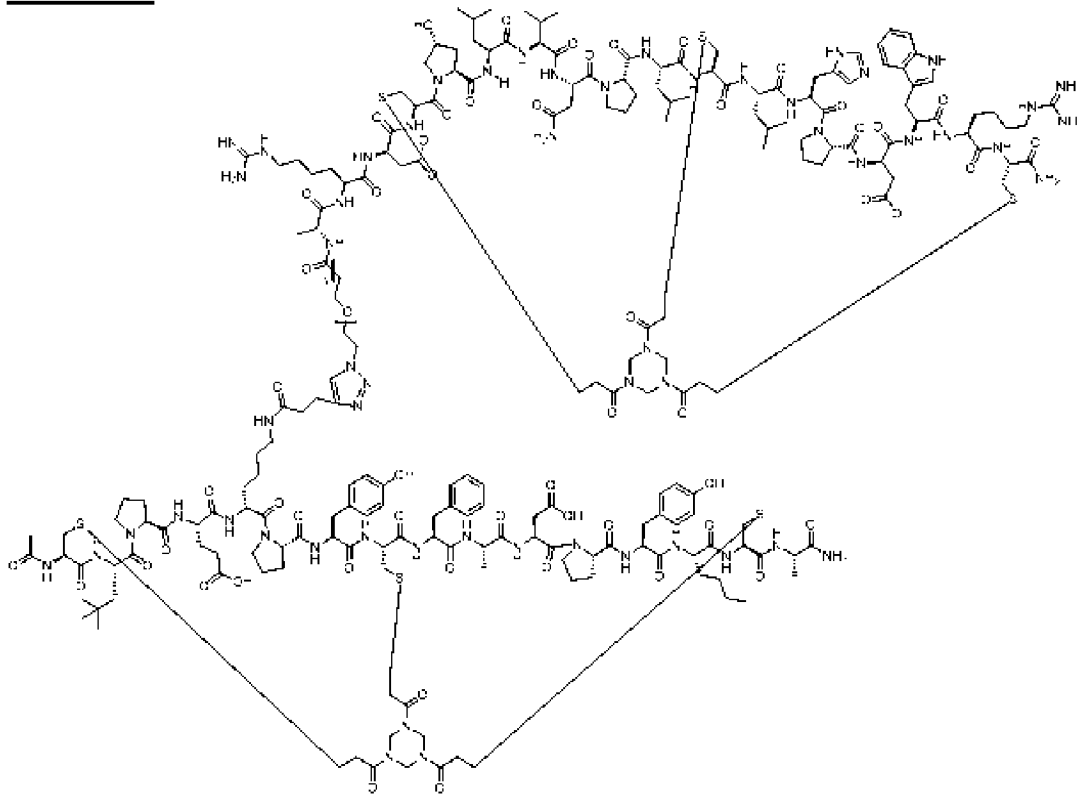
Методика получения BCY10574



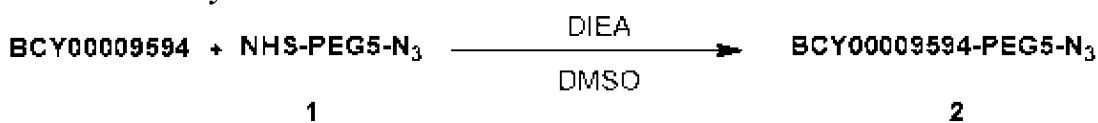
Смесь соединения 2 (20 мг, 7,36 мкмоль, 1,0 экв.), BCY8927 (17 мг, 7,87 мкмоль, 1,07 экв.) и THPTA (0,4 М, 18,4 мл, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем CuSO₄ (0,4 М, 18,4 мл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 36,8 мл, 2,0 экв.) были добавлены под N₂. pH этого раствора довели

до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH_4HCO_3 (в соотношении 1:1 с $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 4877,68, наблюдаемое m/z : 1219,42 ($[\text{M}/4+\text{H}]^+$) и 975,54 ($[\text{M}/5+\text{H}]^+$)). Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ10574 (17,6 мг, 3,41 мкмоль, выход 46,29%, чистота 94,40%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ10575

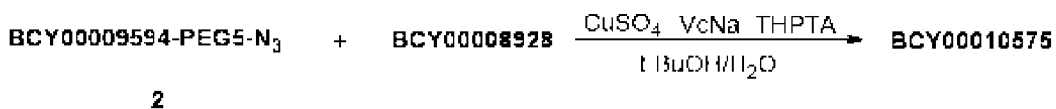


Методика получения соединения 2



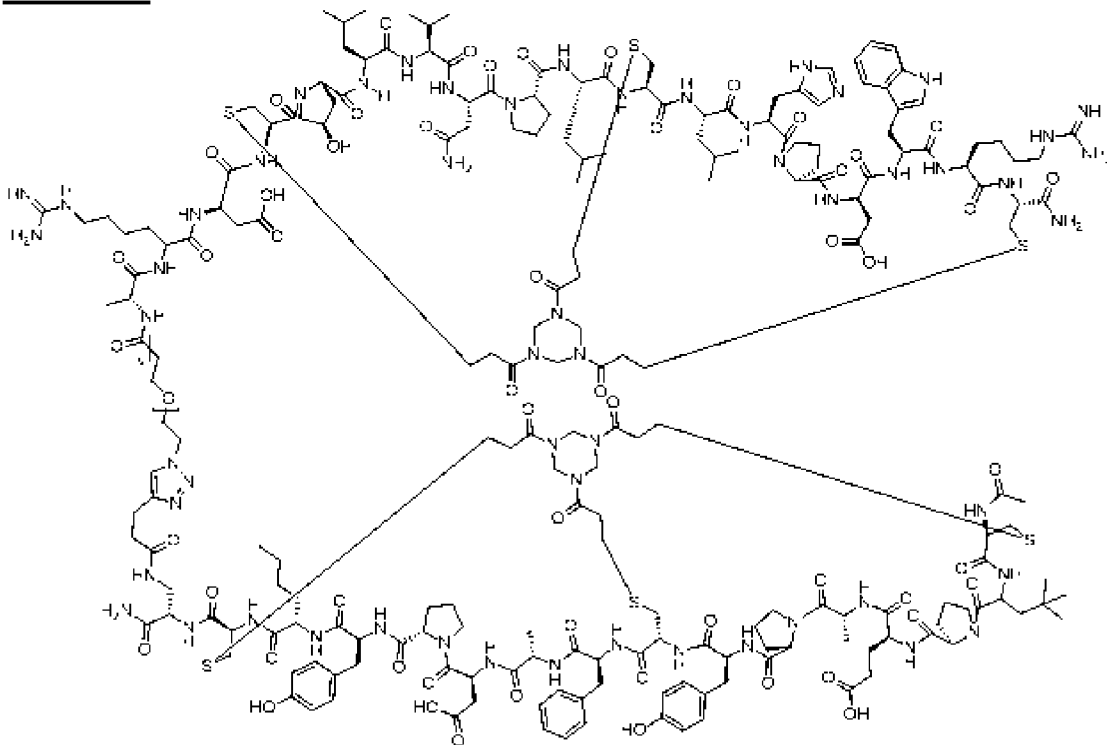
К раствору ВСУ9594 (65 мг, 27,07 мкмоль, 1 экв.), соединения 1 (12,0 мг, 27,75 мкмоль, 1,02 экв.) в DMSO (1 мл) добавляли DIEA (5,25 мг, 40,61 мкмоль, 7,07 мИ, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [расчетный MW: 2718,13, наблюдаемое m/z : 906,04 ($[\text{M}/3+\text{H}]^+$) и 1359,07 ($[\text{M}/2+\text{H}]^+$)]. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (42,6 мг, 15,67 мкмоль, выход 57,89%, чистота 100%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ10575

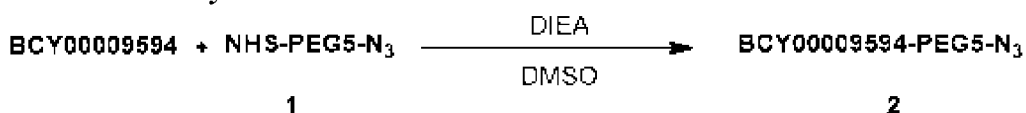


Смесь соединения 2 (20 мг, 7,36 мкмоль, 1,0 экв.), BCY8928 (17 мг, 7,67 мкмоль, 1,04 экв.) и THPTA (0,4 М, 18,4 мл, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 18,4 мл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 36,8 мл, 2,0 экв.) под N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [расчетный MW: 4935,71, наблюдаемое m/z: 1234,59 ([M/4+H]⁺) и 987,71 ([M/5+H]⁺). Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). BCY10575 (12 мг, 2,37 мкмоль, выход 32,27%, чистота 97,67%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY10576



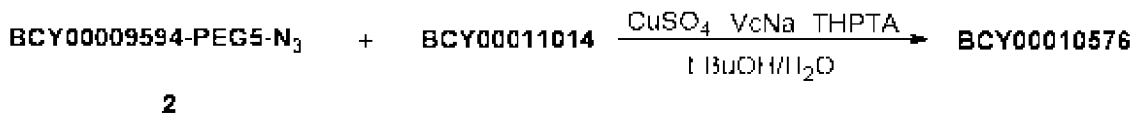
Методика получения соединения 2



К раствору BCY9594 (30,0 мг, 12,50 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 1 (5,54 мг, 12,81 мкмоль, 1,02 экв.) в DMSO (1 мл) добавляли DIEA (2,42 мг, 18,74 мкмоль, 3,3 мл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 1 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [расчетный MW: 2718,13, наблюдаемое m/z: 906,45 ([M/3+H]⁺) и 1359,50

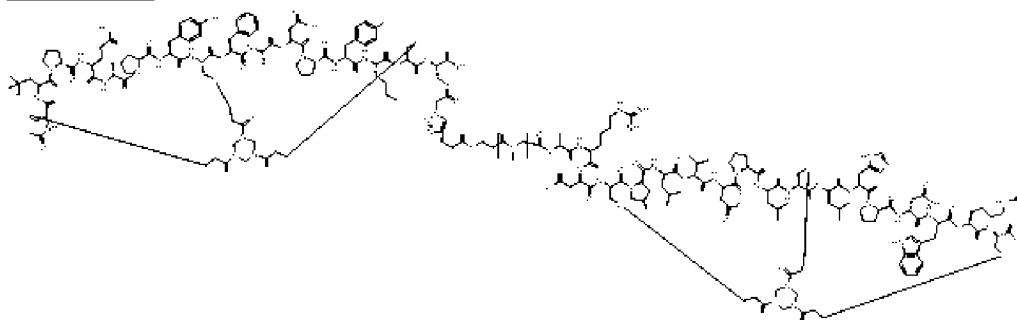
([M/2+H]⁺). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (16 мг, 5,80 мкмоль, выход 46,42%, чистота 98,54%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ10576

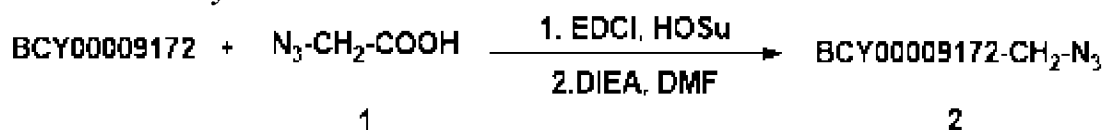


Смесь соединения 2 (17,0 мг, 6,25 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ11014 (13,6 мг, 6,25 мкмоль, 1,0 экв.) и THPTA (0,4 М, 1,8 мл, 2,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 15,6 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 1,84 мл, 2,0 экв.) под N₂. pH этого раствора доводили до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что большая часть соединения 2 была израсходована, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [расчетный MW: 4893,63, наблюдаемое m/z: 1224,7 ([M/4+H]⁺) и 980,0 ([M/6+H]⁺). Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ10576 (20,5 мг, 4,13 мкмоль, выход 66,02%, чистота 98,57%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ10577



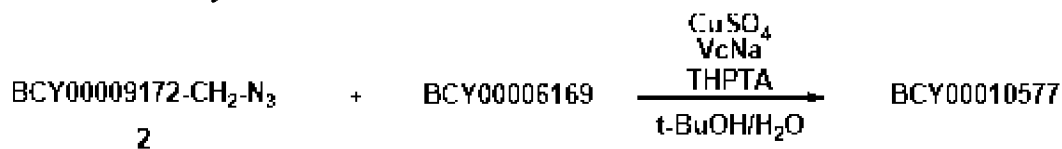
Методика получения соединения 2



К раствору соединения 1 (5,0 мг, 49,5 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли EDCI (8,5 мг, 54,8 мкмоль, 1,1 экв.) и HOSu (5,7 мг, 49,5 мкмоль, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 30 минут. ТСХ показала, что соединение 1 было полностью израсходовано, и образовалось одно новое пятно. Затем к реакционной смеси добавляли ВСУ9172 (53 мг, 25,29 мкмоль, 0,47 экв.) и DIEA (3,27 мг, 25,29 мкмоль, 4,4 мл, 0,47 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что ВСУ9172 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с

желаемым m/z (MW: 2178,46, наблюдаемое m/z : 1089,5700 ($[(M/2+H)^+]$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя и получали остаток. Затем остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях). Соединение 2 (30 мг, 13,77 мкмоль, выход 54,45%, чистота 100%) получали в виде белого твердого вещества.

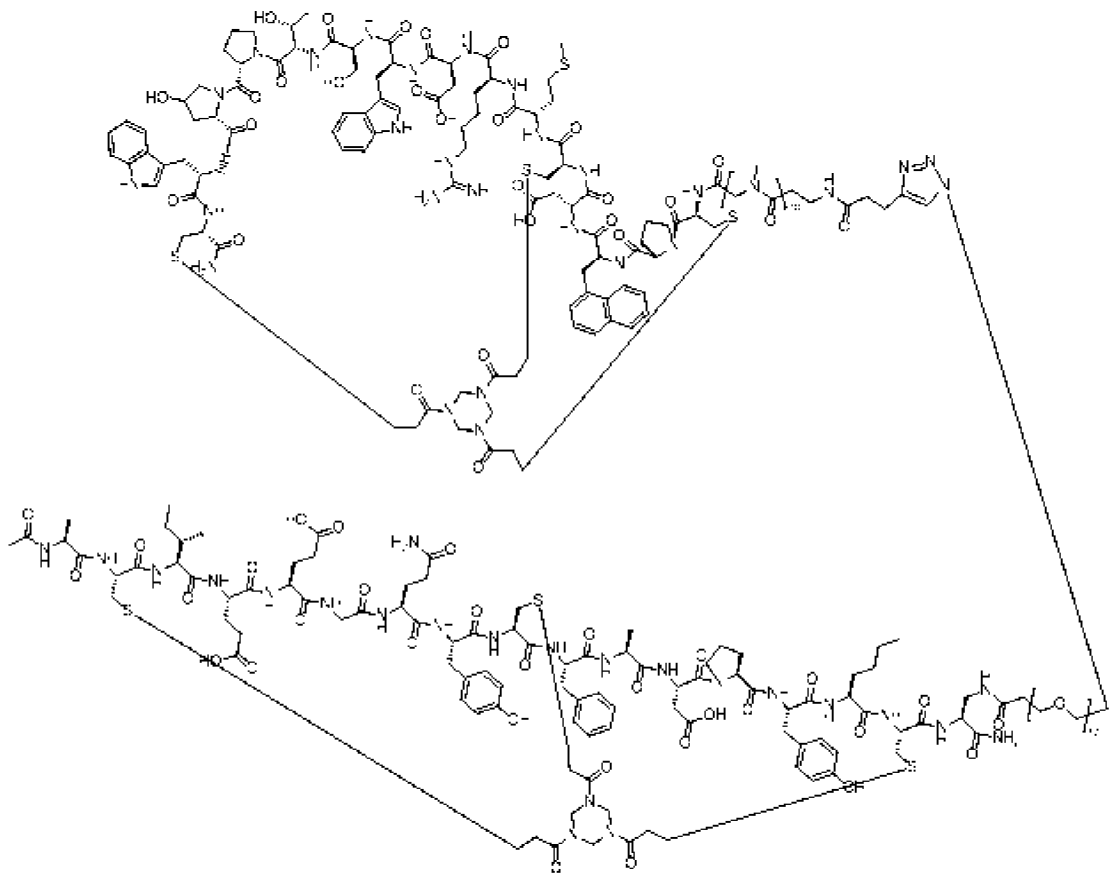
Методика получения ВСУ10577



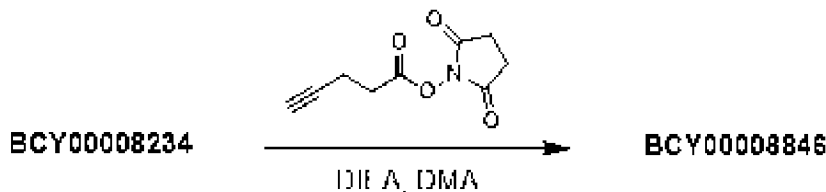
Соединение 2 (20 г, 9,18 мкмоль, 1,0 экв.) и ВСУ6169 (32,95 мг, 10,10 мкмоль, 1,1 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 23 мкл, 1 экв.), VcNa (0,4 М, 46 мл, 2,0 экв.) и THPTA (0,4 М, 23 мл, 1,0 экв.). Наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 4 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 5441,20, наблюдаемое m/z : 1361,8 ($[M/4+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ10577 (16,2 мг, 2,98 мкмоль, выход 32,43%) получали в виде белого твердого вещества.

Пример 3: синтез связывающих нектин-4/CD137 гетеротандемных бициклических пептидов

ВСУ8854

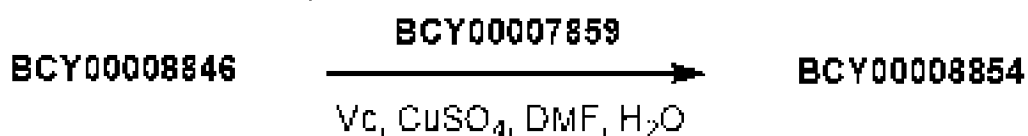


Общая методика получения VCY8846



К раствору VCY8234 (пептида, идентичного VCY8846, за исключением отсутствия фрагмента PYA; 300 г, 102 мкмоль, 1,0 экв.) в DMA (3 мл) добавляли DIEA (52,5 мг, 406 мкмоль, 70,8 мкл, 4,0 экв.) при перемешивании в течение 10 мин. Затем к смеси добавляли (2,5-диоксопирролидин-1-ил)пент-4-иноат (25,8 мг, 132 мкмоль, 1,3 экв.), и смесь дополнительно перемешивали при 20°C в течение дополнительных 16 часов. ЖХ-МС анализ показал, что VCY8234 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 3034,43, наблюдаемое m/z : 1011,8 ($[[M/3+H]^+$), 1517,0 ($[[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях), получая соединение VCY8846 (290 мг, 95,6 мкмоль, выход 94,1%) в виде белого твердого вещества.

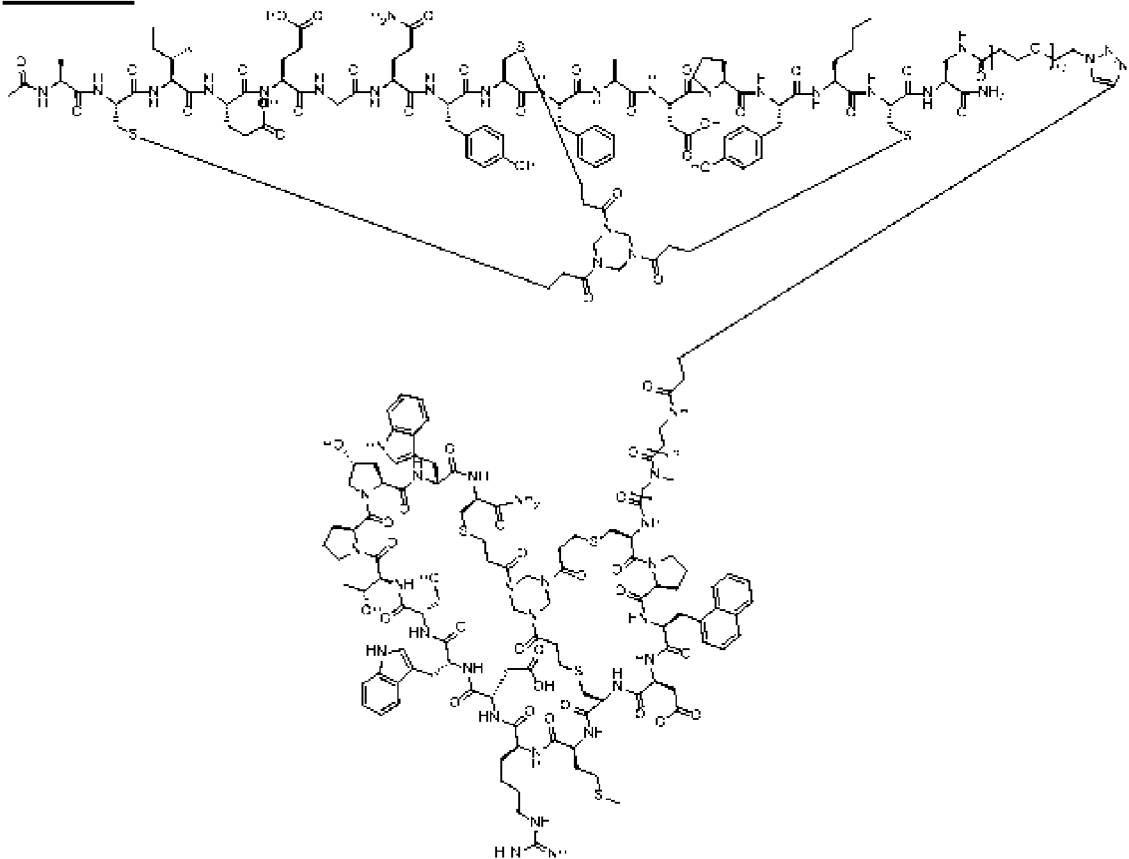
Общая методика получения VCY8854



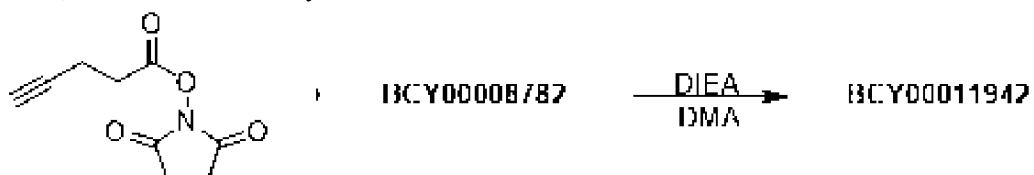
К раствору VCY8846 (234 мг, 77,1 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (5 мл) добавляли

BCY7859 (которое может быть получено, как описано в BCY7985; 220 мг, 77,8 мкмоль, 1,0 экв.) с последующим добавлением (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-он (0,80 М, 963 мкл, 1,0 экв.) и CuSO_4 (0,80 М, 289 мл, 0,3 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BCY8846 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 5861,59, наблюдаемое m/z : 837,9 ($[[M/7+H]^+$), 977,6 ($[[M/6+H]^+$), 1173,3 ($[[M/5+H]^+$)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% TFA в H_2O , В: ACN (ацетонитрил)), получая соединение BCY8854 (292 мг, 46,8 мкмоль, выход 60,8%, чистота 95,9%, TFA) в виде белого твердого вещества.

BCY9350



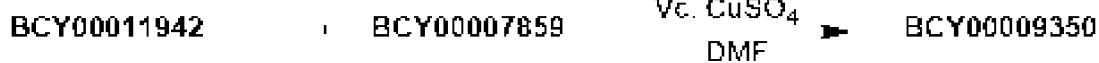
Общая методика получения BCY8782-РУА



К раствору BCY8782 (пептида, идентичного BCY11942, за исключением отсутствия фрагмента РУА; 20,0 мг, 6,77 мкмоль, 1,0 экв.) в DMA (1 мл) добавляли DIEA (4,37 мг, 33,9 мкмоль, 5,90 мкл, 5,0 экв.) и (2,5-диоксопирролидин-1-ил)пент-4-инноат (2,64 мг, 13,5 мкмоль, 2,0 экв.) при перемешивании в течение 12 часов при 25°C. ЖХ-МС анализ показал, что BCY8782 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 3034,43, наблюдаемое m/z : 1012,1

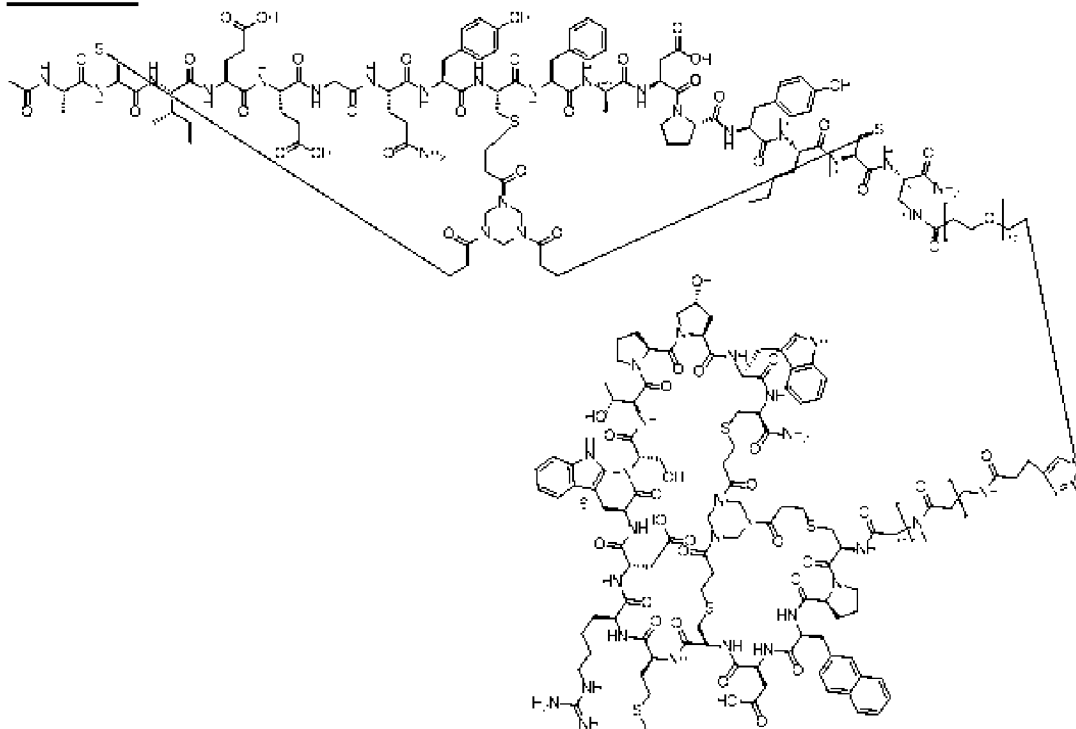
[[M/3+H]⁺). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях), получая ВСУ11942 (20,0 мг, 6,00 мкмоль, выход 88,6%, чистота 91,0%) в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения ВСУ9350

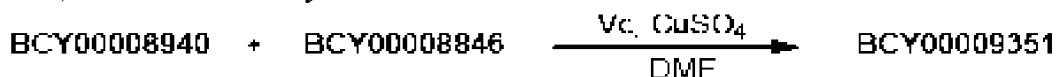


К раствору ВСУ11942 (20 мг, 6,59 мкмоль, 1,0 экв.) и ВСУ7859 (которое может быть получено, как описано в ВСУ7985; 20,5 мг, 7,25 мкмоль, 1,1 экв.) в DMF (1 мл) добавляли (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-он (0,4 М, 330 мл, 20,0 экв.), и к смеси добавляли CuSO₄ (0,4 М, 98,9 мл, 6,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что ВСУ8782-РУА было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 5861,59, наблюдаемое m/z: 1173,3 [M/5+H]⁺). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% TFA в H₂O, В: ACN), получая ВСУ9350 (14,5 мг, 2,40 мкмоль, выход 36,5%, чистота 97,2%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ9351



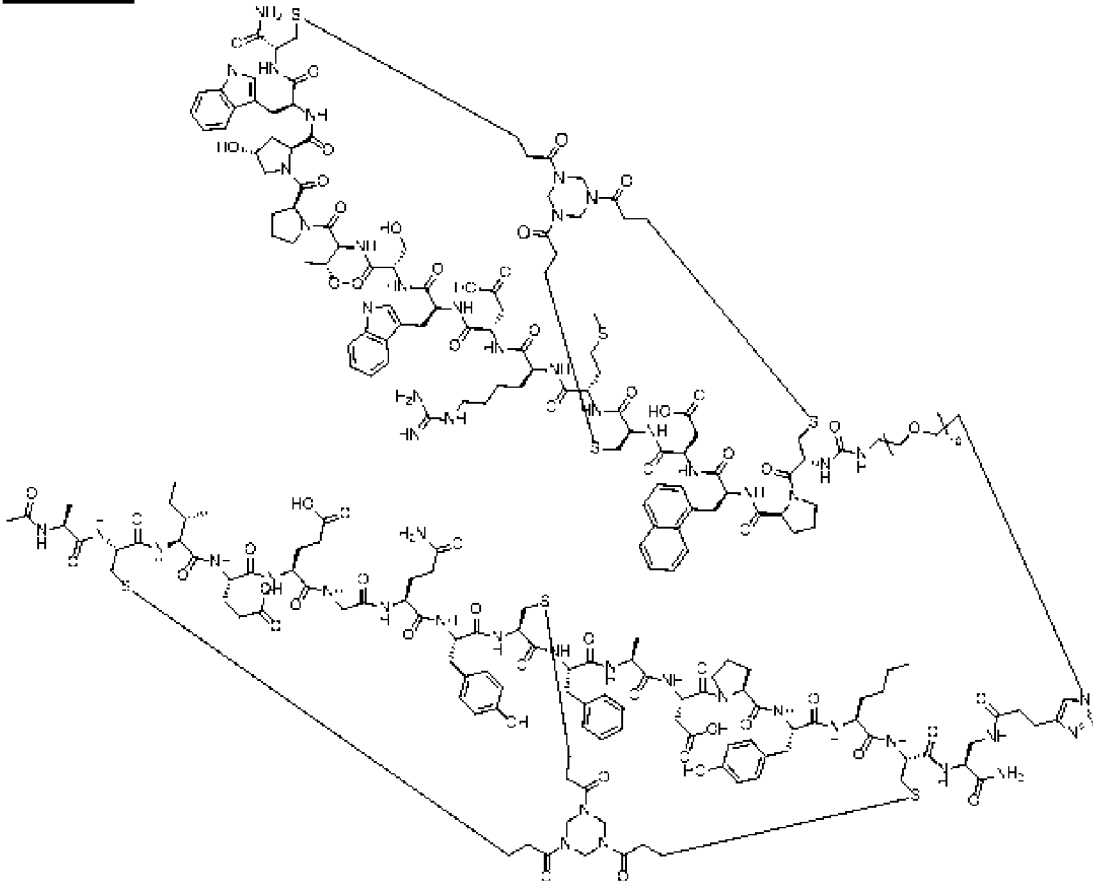
Общая методика получения ВСУ9351



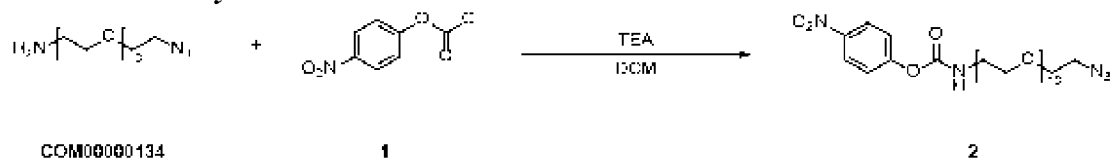
К раствору ВСУ8940 (которое может быть получено, как описано в ВСУ8942; 9,4 мг, 3,33 мкмоль, 1,01 экв.) и ВСУ8846 (10,0 мг, 3,30 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли Vc (0,4 М, 165 мкл, 20,0 экв.) и CuSO₄ (0,4 М, 49,4 мл, 6,0 экв.) в атмосфере азота. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХ-МС анализ показал, что ВСУ8940 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с

желаемым m/z (расчетный MW: 5861,59, наблюдаемое m/z : 975,4 $[M/6+H]^+$, 1172,3 $[M/5+H]^+$). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% TFA в H_2O , В: ACN), получая ВСУ9351 (5,30 мг, 0,904 мкмоль, выход 26,3%, чистота 96,0%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ9399

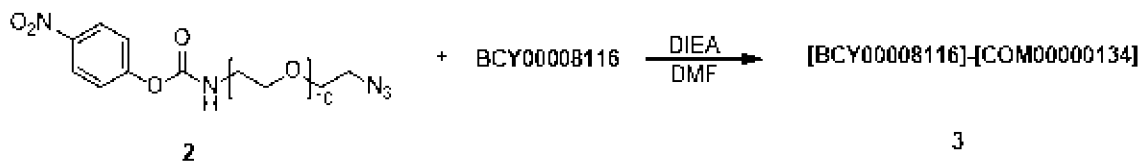


Методика получения соединения 2



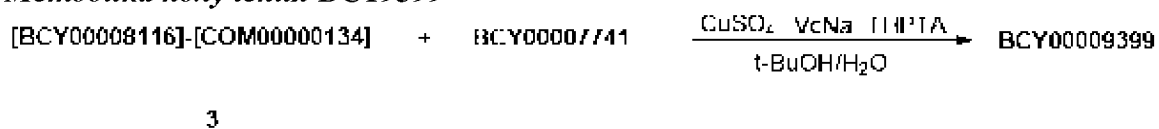
К раствору СОМ134 (30 мг, 56,97 мкмоль), соединения 1 (17,22 мг, 85,45 мкмоль) в DCM (0,5 мл) добавляли TEA (8,65 мг, 85,45 мкмоль, 11,9 мл). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХ-МС анализ показал, что СОМ134 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 691,72, наблюдаемое m/z : 692,3 $([M+H]^+)$ и 709,3 $([M+NH_4]^+)$). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях). Соединение 2 (30,5 мг) получали в виде бесцветного масла.

Методика получения соединения 3



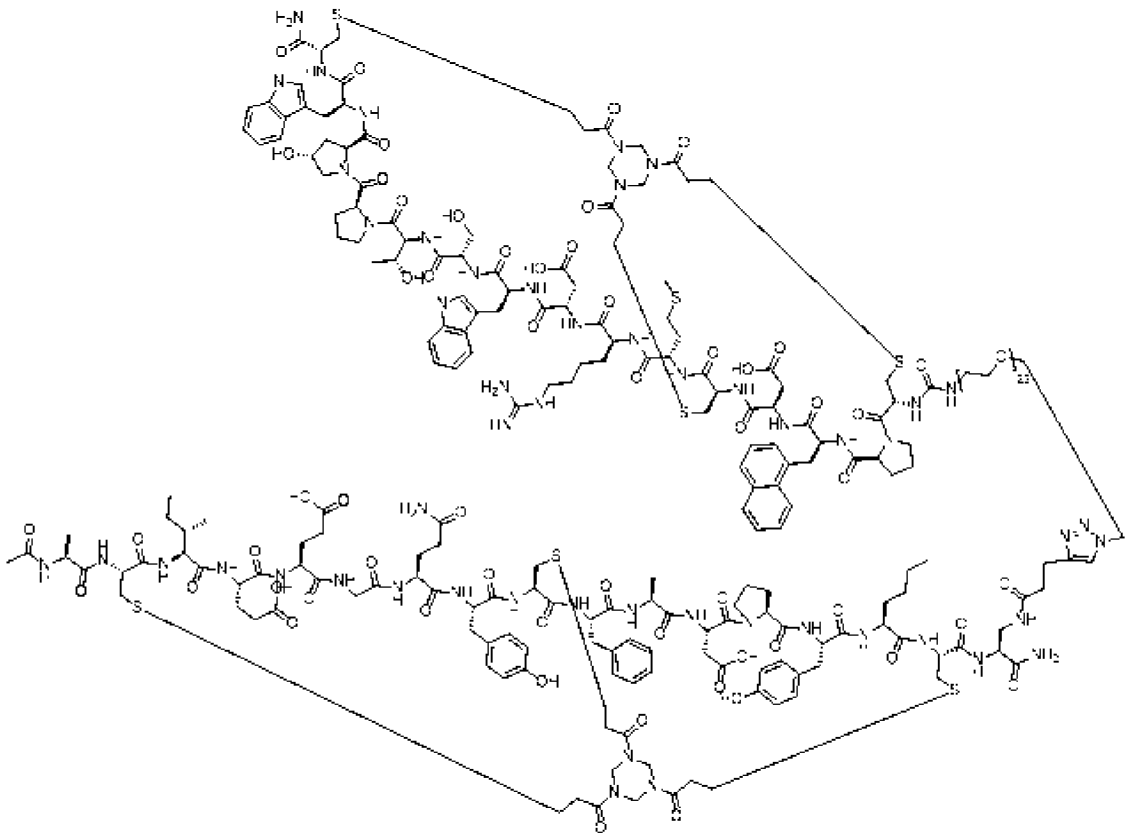
К раствору соединения 2 (15 мг, 21,68 мкмоль) и ВСУ8116 (47 мг, 21,68 мкмоль) в DMF (1 мл) добавляли DIEA (8,41 мг, 65,05 мкмоль, 11,33 мкл). Смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 2725,1, наблюдаемое m/z : 1362,7 ($[M/2+H]^+$), 909,0 ($[M/3+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (20 мг, выход 33,41%, чистота 98,71%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ9399

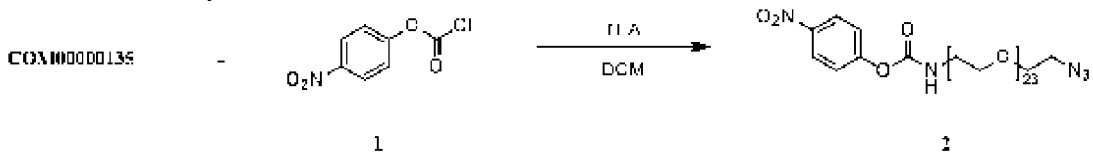


Смесь соединения 3 (20,0 мг, 5,35 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ7741 (13,0 мг, 5,70 мкмоль, 1,01 экв.) и ТНРТА (0,4 М, 13,4 мкл, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем CuSO₄ (0,4 М, 13,4 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 26,8 мкл, 2,0 экв.) были добавлены под N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [MW: 5006,64, наблюдаемое m/z : 834,9 ($[M/6+H]^+$), 1002,3 ($[M/5+H]^+$), 1252,4 ($[M/4+H]^+$)]. Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ9399 (9,1 мг, выход 27,20%, чистота 96,29%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ9400

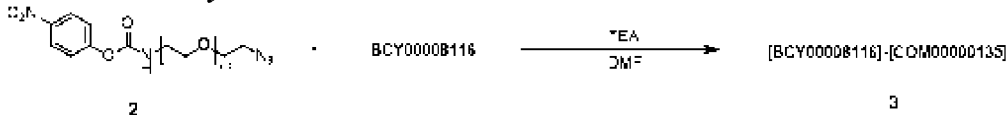


Методика получения соединения 2



К раствору СОМ135 (которое может быть получено, как описано в ВСУ9648; 30,0 мг, 27,29 мкмоль), соединение 1 (8,3 мг, 40,94 мкмоль) в DCM (2 мл) добавляли ТЕА (4,14 мг, 40,94 мкмоль, 5,7 пл). Затем реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 часа. ЖХ-МС анализ показал, что СОМ135 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 1264,40, наблюдаемое m/z : 1281,4 ($[M+NH_4]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях), получая соединение 2 (18 мг) в виде белого твердого вещества.

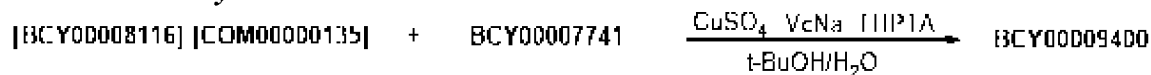
Методика получения соединения 3



К раствору соединения 2 (15,5 мг, 7,12 мкмоль) и ВСУ8116 (9 мг, 7,12 мкмоль) в DMF (2 мл) добавляли DIEA (1,4 мг, 10,68 мкмоль, 1,9 мкл). Смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 3297,78, наблюдаемое m/z : 1099,7 ($[M/3+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт

очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (19,5 мг, 5,91 мкмоль, выход 33,41%, чистота 83,07%) получали в виде белого твердого вещества.

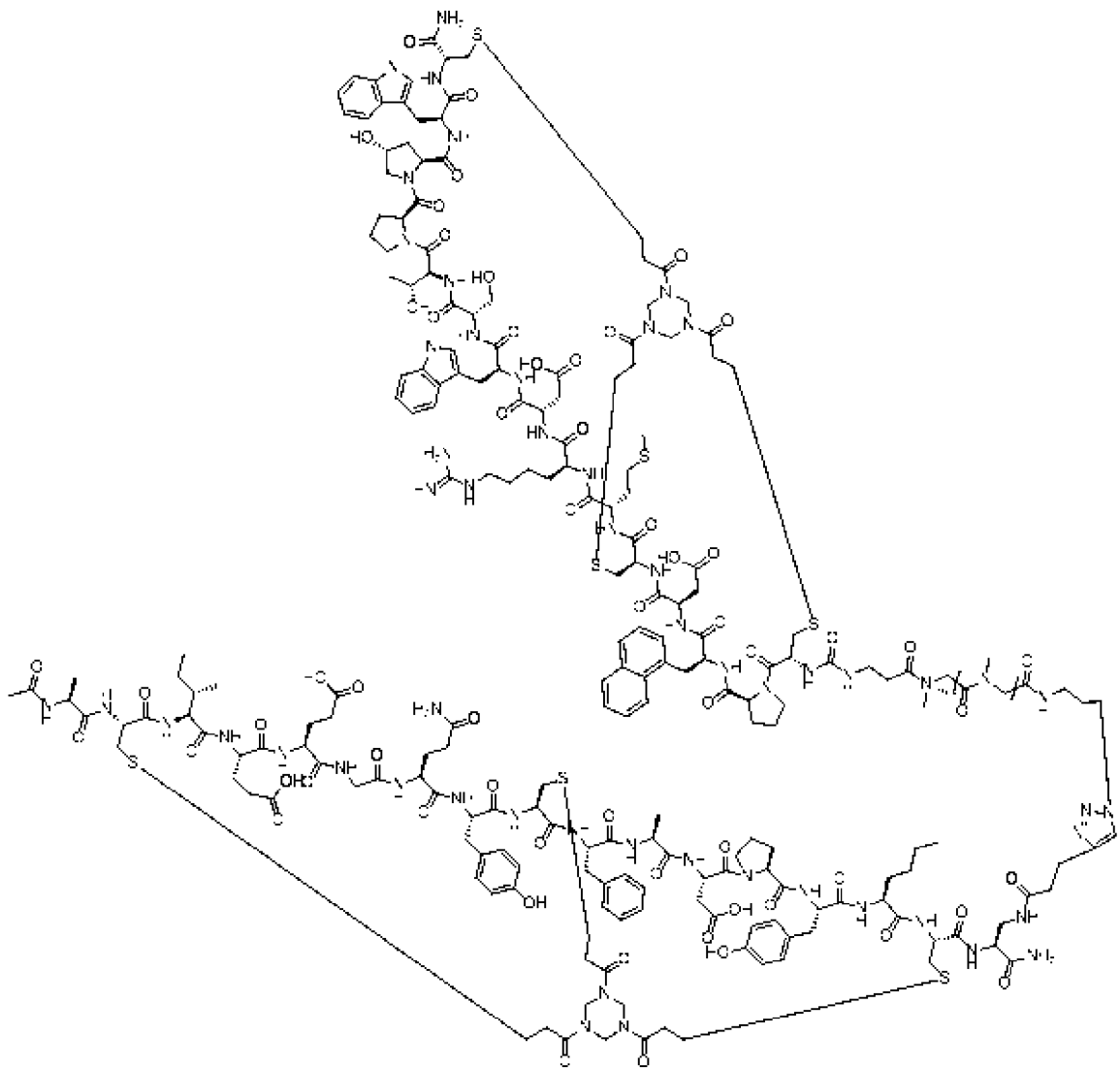
Методика получения ВСУ9400



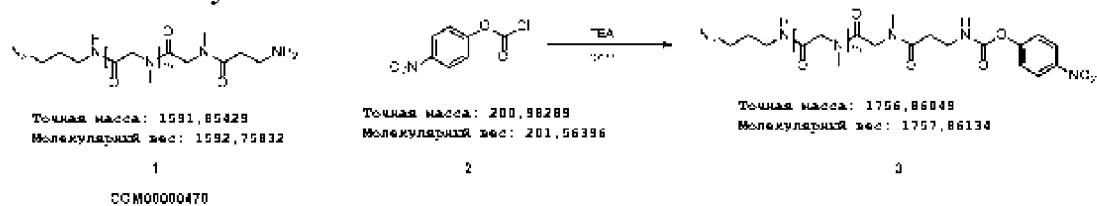
3

Смесь соединения 3 (19,5 мг, 5,91 мкмоль), ВСУ7741 (14 мг, 6,14 мкмоль, 1,01 экв.) и THPTA (0,4 М, 15 мкл, 1 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 15 мкл, 1 экв.) и VcNa (0,4 М, 30 мкл, 2 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [MW: 5579,31, наблюдаемое m/z: 930,5 ([M/6+H]⁺), 1116,6 ([M/5+H]⁺)]. Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ9400 (13,9 мг, 2,33 мкмоль, выход 27,20%, чистота 93,56%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ9401



Методика получения соединения 3



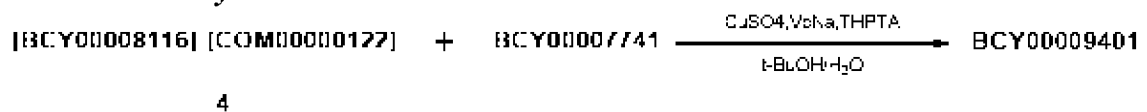
К раствору соединения 1 (50,0 г, 31,39 мкмоль, 1 экв.), соединения 2 (6,6 мг, 32,96 мкмоль, 1,05 экв.) в DCM (2 мл) добавляли TEA (4,8 мг, 47,09 мкмоль, 6,6 мкл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 1 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (молекулярная масса: 1757,86 наблюдаемое m/z : 879,10 ($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (0,02 г, 6,56 мкмоль, выход 20,91%, чистота 57,7%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения соединения 4



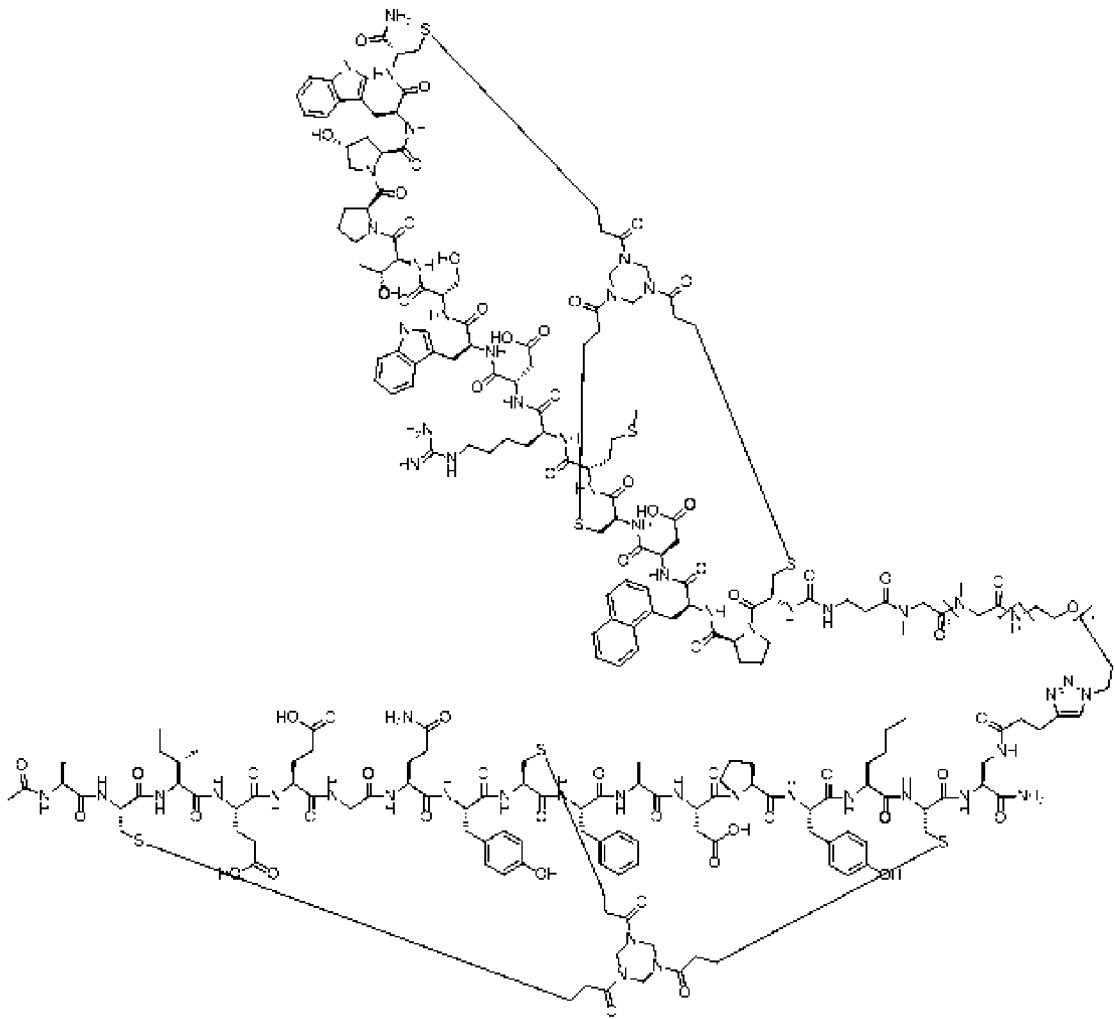
К раствору соединения 3 (20 г, 11,38 мкмоль, 1 экв.), ВСУ8116 (25 мг, 11,51 мкмоль, 1,01 экв.) в DMF (4 мл) добавляли DIEA (2,2 мг, 17,07 мкмоль, 2,97 мкл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 3791,23, наблюдаемое m/z: 1263,2 ([M/3+H]⁺)). Реакционную смесь очищали напрямую препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях). Соединение 4 (10 мг, 2,43 мкмоль, выход 21,33%, чистота 92%) получали в виде бесцветного масла.

Методика получения ВСУ9401

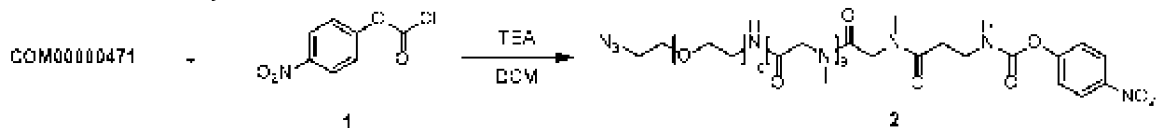


Смесь соединения 4 (10 мг, 2,43 мкмоль, 0,9 экв.), ВСУ7741 (6,32 мг, 2,77 мкмоль, 1,0 экв.) и THPTA (0,4 М, 6,7 мкл, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем CuSO₄ (0,4 М, 6,7 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 13,4 мкл, 2,0 экв.) были добавлены под N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 4 было израсходовано полностью, и один был обнаружен основной пик с желаемым m/z [MW: 6072,77, наблюдаемое m/z: 1012,00 ([M/6+H]⁺)]. Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ9401 (8,4 мг, 1,56 мкмоль, выход 59,31%, чистота 95,52%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ9403

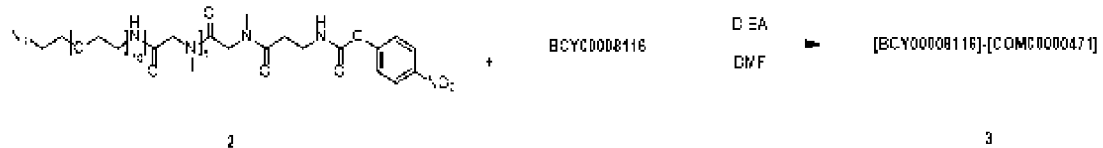


Методика получения соединения 2



К раствору COM471 (100,0 мг, 76,42 мкмоль, 1,0 экв.), 4-нитрофенилхлорформиата (16,2 мг, 80,25 мкмоль, 1,05 экв.) в DCM (10 мл) добавляли TEA (11,6 мг, 114,64 мкмоль, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что COM471 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 1473,58, наблюдаемое m/z : 736,83 ($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (62,8 мг, 42,67 мкмоль, выход 55,84%, чистота 48,37%) получали в виде белого масла.

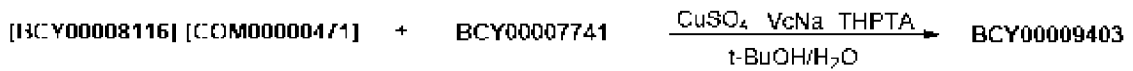
Методика получения соединения 3



К раствору соединения 2 (44 мг, 29,46 мкмоль, 1,0 экв.) BCY8116 (63 мг, 29,18 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (2 мл) добавляли DIEA (5,66 мг, 43,77 мкмоль, 1,5 экв.).

Смесь перемешивали при 40°C в течение 12 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 3506,95, наблюдаемое m/z : 1168,58 ($[M/3+H]^+$)). Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (20 мг, 5,42 мкмоль, выход 18,57%, чистота 95,04%) получали в виде белого твердого вещества.

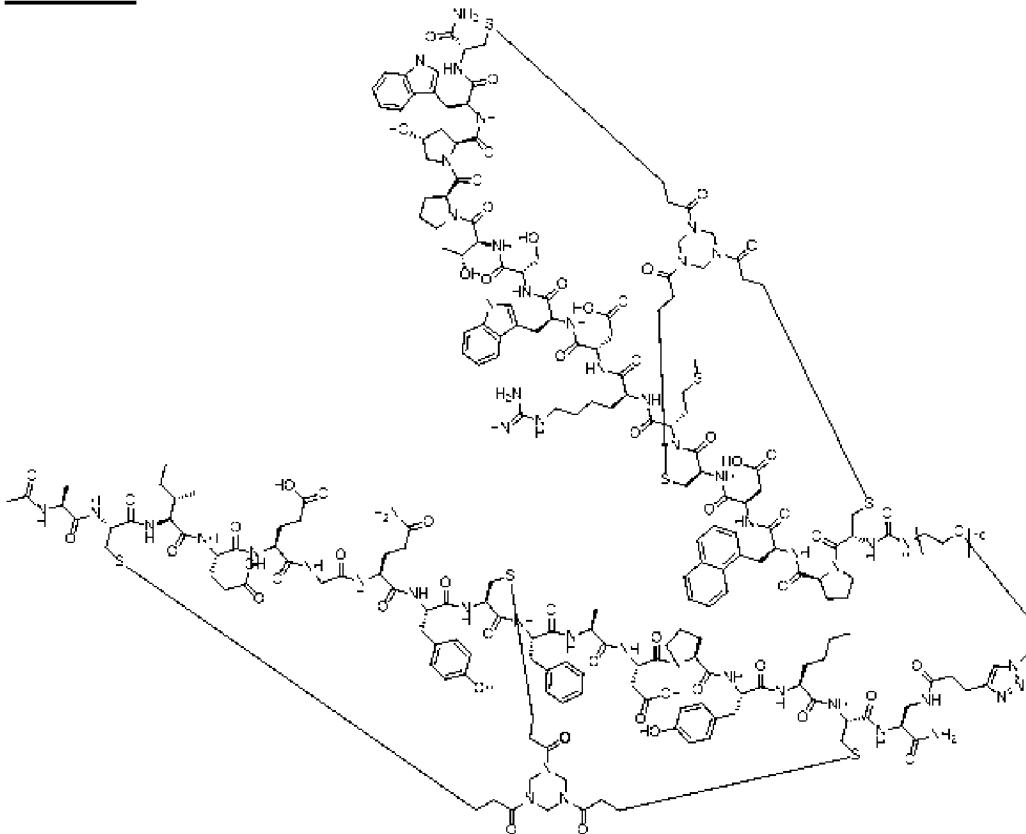
Методика получения ВСУ9403



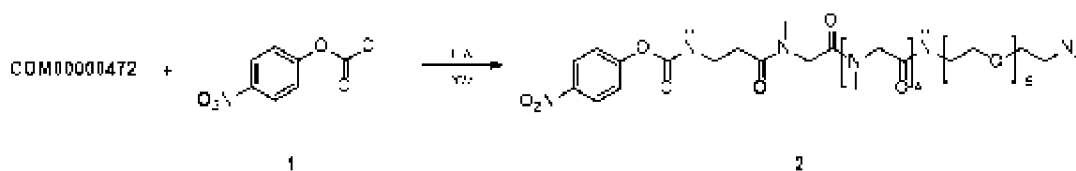
3

Смесь соединения 3 (10,0 мг, 2,71 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ7741 (6,83 мг, 2,99 мкмоль, 1,1 экв.) и THPTA (0,4 М, 7 мкл, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 7 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 14 мкл, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [MW: 5788,49, наблюдаемое m/z : 1157,00 ($[M/5+H]^+$) и 964,60 ($[M/6+H]^+$)]. Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ9403 (2,1 мг, 0,34 мкмоль, выход 11,93%, чистота 93,80%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ9405

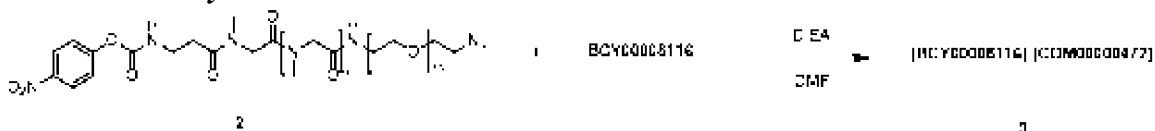


Методика получения соединения 2



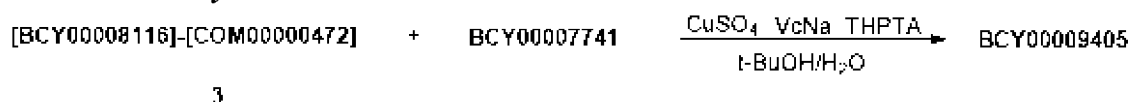
К раствору COM472 (44,7 мг, 38,1 мкмоль), соединения 1 (9,2 мг, 45,72 мкмоль) в DCM (4 мл) добавляли TEA (5,8 мг, 57,14 мкмоль, 8 мл). Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что COM472 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 1338,45, наблюдаемое m/z : 686,23 ($[M/2+NH_4^+]$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях). Соединение 2 (20 мг, 14,94 мкмоль, выход 39,2%) получали в виде бесцветного масла.

Методика получения соединения 3



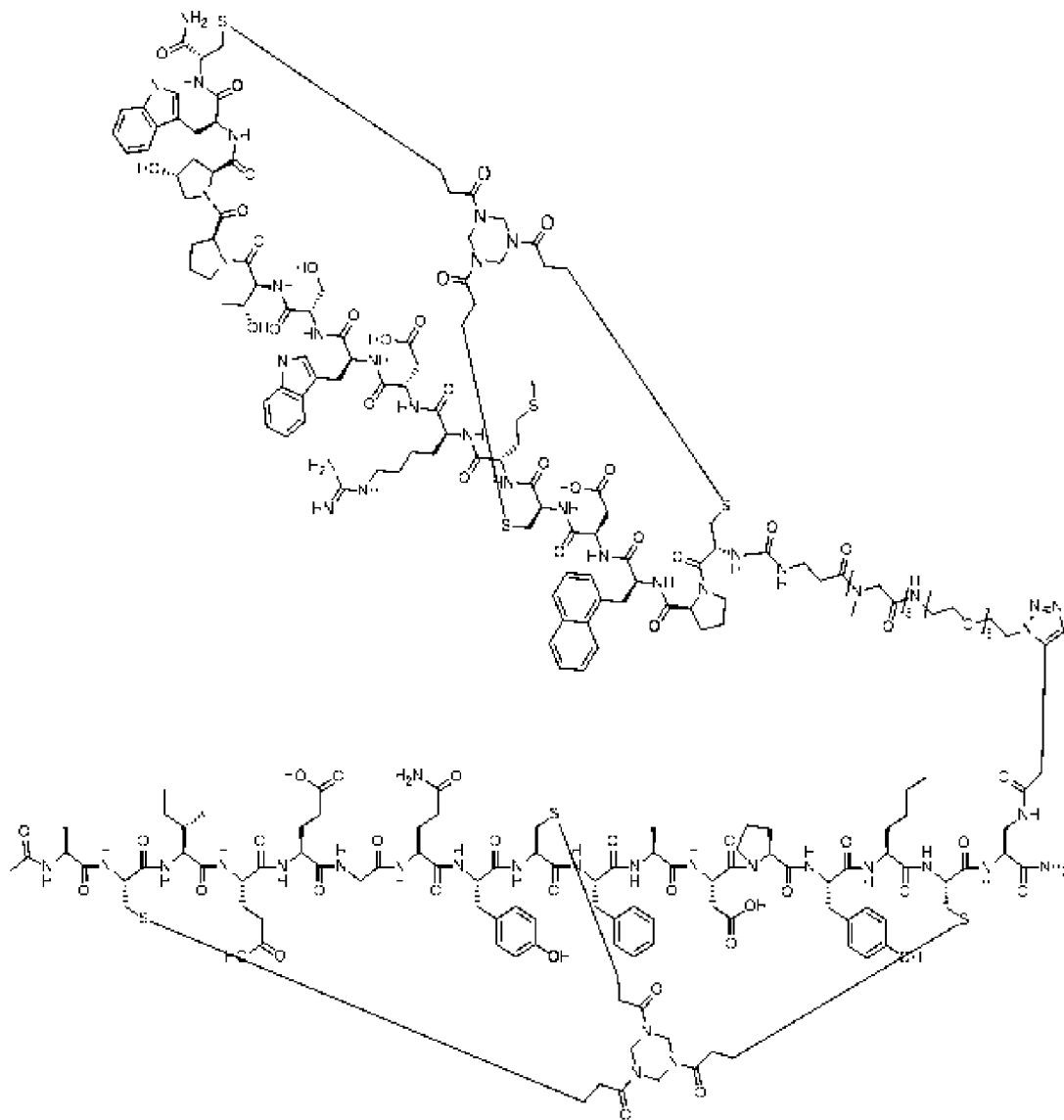
К раствору соединения 2 (20 мг, 14,94 мкмоль) и BCY8116 (38,96 мг, 17,93 мкмоль) в DMF (4 мл) добавляли DIEA (1,9 мг, 14,94 мкмоль, 2,6 мкл). Смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 3371,82, наблюдаемое m/z : 1123,94 ($[M/3+H^+]$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (10 мг, выход 99,07%, чистота 19,66) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY9405

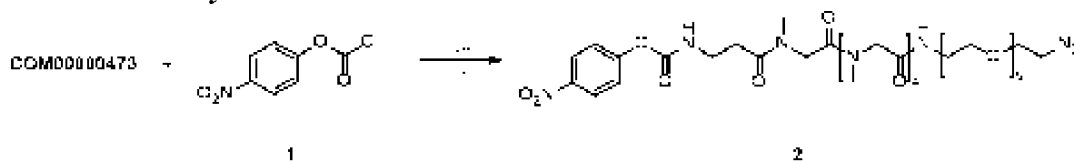


Смесь соединения 3 (10,0 мг, 2,97 мкмоль, 1,0 экв.), BCY7741 (7,4 мг, 3,26 мкмоль, 1,1 экв.) и THPTA (1,3 мг, 2,97 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в *t*-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 7,5 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 151 мкл, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с *t*-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [MW: 5653,36, наблюдаемое m/z : 1130,47 ($[M/5+H]^+$)]. Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). BCY9405 (7,8 мг, выход 46,08%, чистота 97,8%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY9406



Методика получения соединения 2



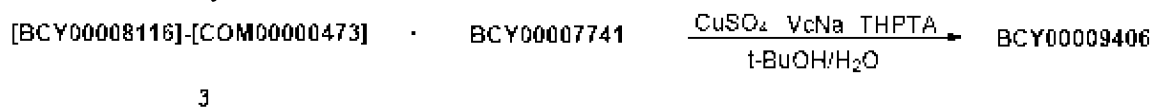
К раствору COM473 (130,0 мг, 177,40 мкмоль, 1,0 экв.), (4-нитрофенил)карбонхлорида (36,4 мг, 180,59 мкмоль, 1,02 экв.) в DCM (3 мл) добавляли ТЕА (27,0 мг, 266,09 мкмоль, 37 мл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 35°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что COM473 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 897,93, наблюдаемое m/z : 897,65 ($[M+H]^+$), 914,60 ($[M+NH_4]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (90 мг, 95,87 мкмоль, выход 54,04%, чистота 95,65%) получали в виде бесцветного масла.

Методика получения соединения 3



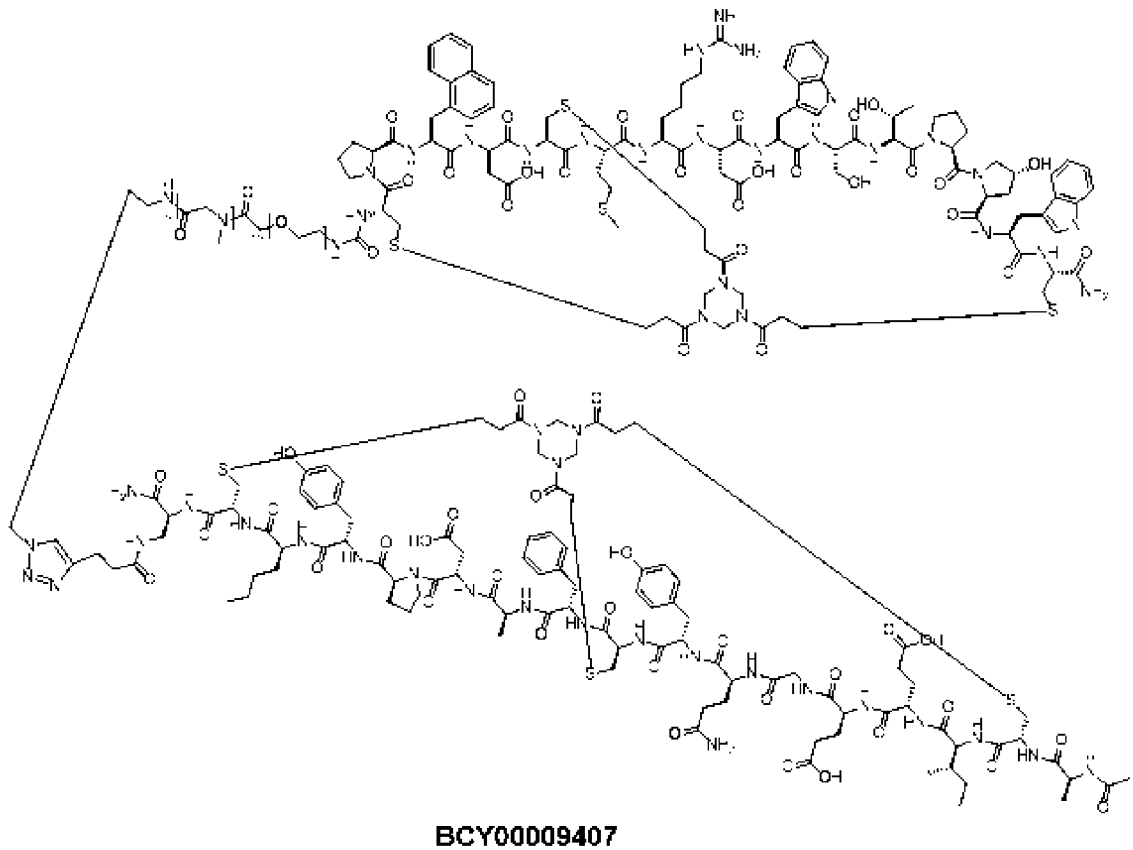
К раствору соединения 2 (10 мг, 11,14 мкмоль, 1 экв.), ВСУ8116 (25 мг, 11,51 мкмоль, 1,03 экв.) в DMF (2 мл) добавляли DIEA (2,16 мг, 16,71 мкмоль, 2,91 мл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 2931,30, наблюдаемое m/z : 977,00 ($[[M/3+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (15 мг, 5,12 мкмоль, выход 45,79%, чистота 99,66%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ9406

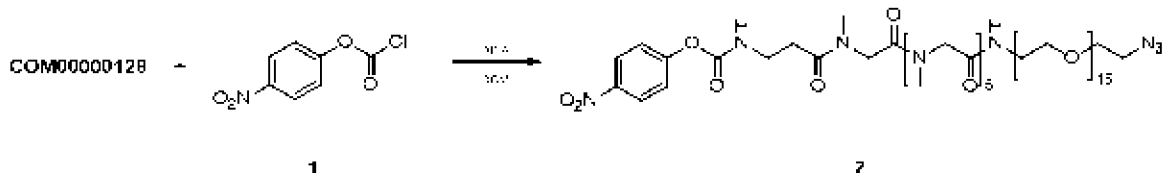


Смесь соединения 3 (15 мг, 5,12 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ7741 (12 мг, 5,26 мкмоль, 1,03 экв.) и THPTA (0,4 М, 12,8 мкл, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 12,8 мл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 25,6 мл, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [MW: 5212,84 наблюдаемое m/z : 1042,74 ($[[M/4+H]^+$)). Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ9406 (14,4 мг, 2,57 мкмоль, выход 50,21%, чистота 93,01%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ9407



Методика получения соединения 2



К раствору COM128 (60 мг, 50,53 мкмоль, 1,0 экв.) соединения 1 (13 мг, 64,50 мкмоль, 1,28 экв.) добавляли DIEA (9,80 мг, 75,80 мкмоль, 13,20 мл, 1,5 экв.) в DCM (5 мл), дегазировали и продували N_2 3 раза, а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 часа в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что COM128 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 1352,48, наблюдаемое m/z : 676,7 ($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (12 мг, 8,87 мкмоль, выход 17,56%) получали в виде бесцветного масла.

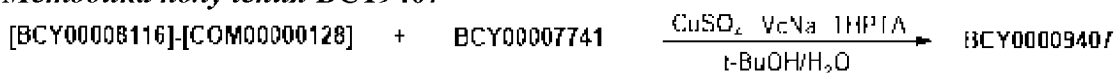
Методика получения [BCY8116]-[COM128]



К раствору соединения 2 (7 мг, 5,18 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY8116 (11 мг, 5,06 мкмоль, 1,0 экв.) добавляли DIEA (2,01 мг, 15,53 мкмоль, 2,70 мкл, 3,0 экв.) в DMF (3 мл), дегазировали и продували N_2 3 раза, а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 часа в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один основной пик с

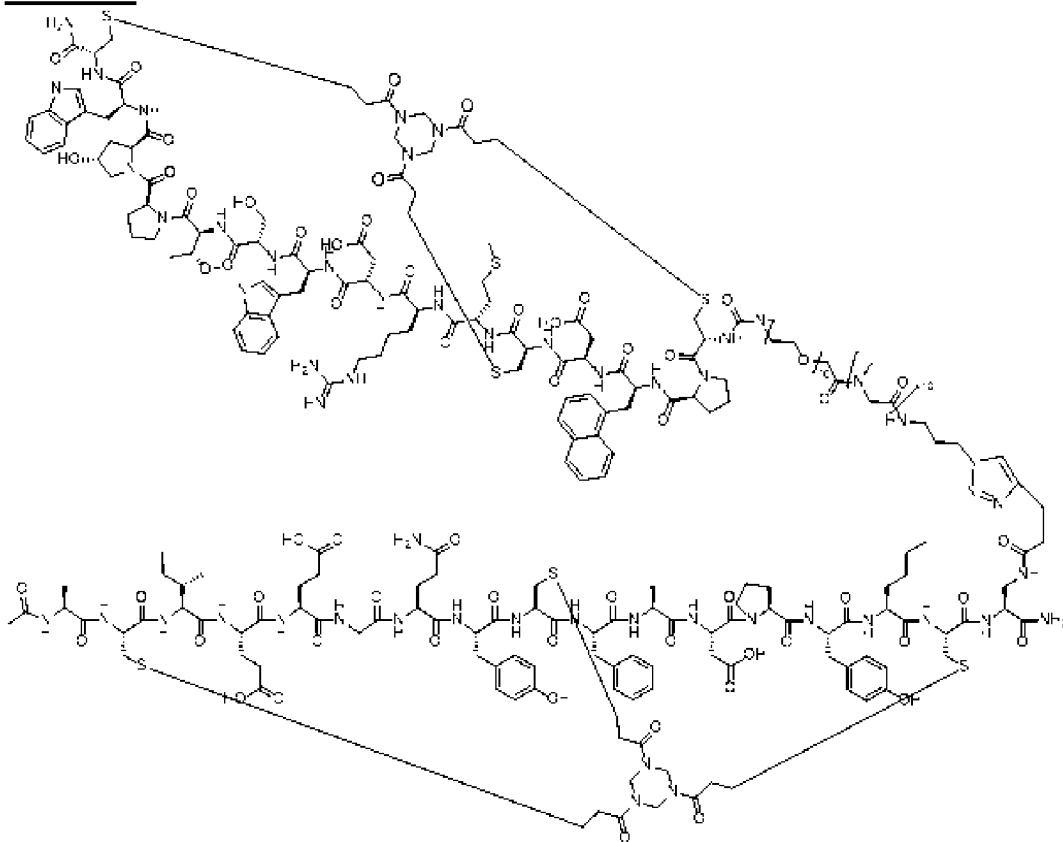
желаемым m/z (вычисленное MW: 3385,85, наблюдаемое m/z : 1129,3 ($[[M/3+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). [VCY8116]-[COM128] (15,6 мг, 4,46 мкмоль, выход 86,13%, чистота 96,75%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения VCY9407

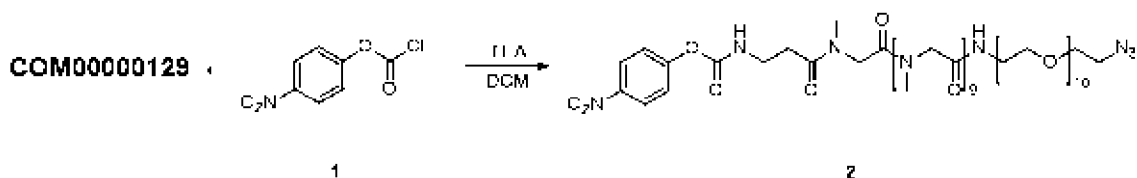


Смесь [VCY8116]-[COM128] (15,6 мг, 4,61 мкмоль, 1,0 экв.), VCY7741 (11 мг, 4,82 мкмоль, 1,05 экв.) и TNPtA (0,8 М, 5,8 мкл, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем CuSO₄ (0,4 М, 11,6 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 23,2 мкл, 2,0 экв.) были добавлены под N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один пик с желаемым m/z (вычисленное MW: 5667,39, наблюдаемое m/z : 945,6 ($[[M/6+H]^+$) и 1134,2 ($[[M/5+H]^+$)). Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). VCY9407 (1,3 мг, 0,23 мкмоль, выход 4,33%, чистота 86,90%) получали в виде белого твердого вещества.

VCY9408

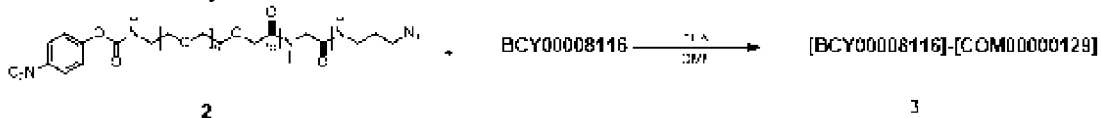


Методика получения соединения 2



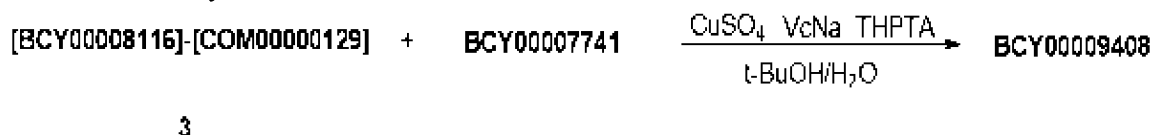
К раствору COM129 (45,0 мг, 34,39 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 1 (15,0 мг, 74,42 мкмоль, 2,1 экв.) в DCM (5 мл) добавляли TEA (5,5 мг, 53,88 мкмоль, 7,5 мл, 1,5 экв.), а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 часа в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что COM129 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 1473,58, наблюдаемое m/z: 737,3 ([M/2+H]⁺)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (9 мг, 6,11 мкмоль, выход 17,01%, чистота 95,76%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения соединения 3



К раствору соединения 2 (9,0 мг, 6,11 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY8116 (13,3 мг, 6,11 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (3 мл) добавляли DIEA (2,4 мг, 18,32 мкмоль, 3,2 мкл, 3,0 экв.). Все растворители дегазировали и продували N₂ 3 раза, а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 часа в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 3506,95, наблюдаемое m/z: 877,4 ([M/4+H]⁺) и m/z: 1169,6 ([M/3+H]⁺)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (7,2 мг, 2,05 мкмоль, выход 31,93%, чистота 95%) получали в виде белого твердого вещества.

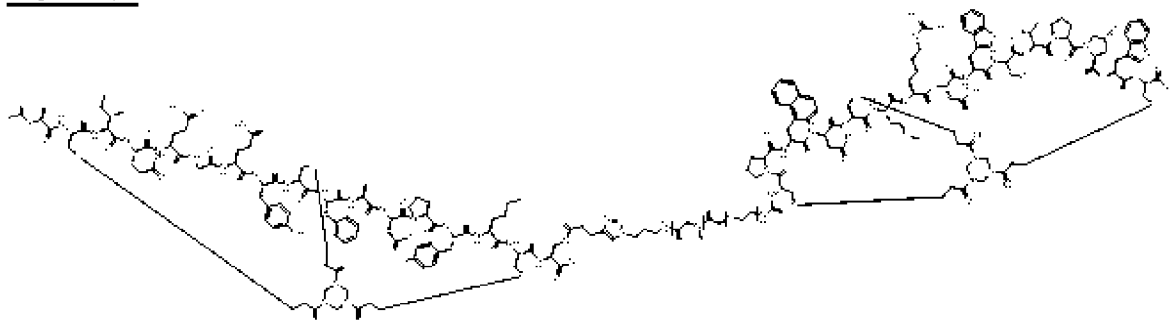
Методика получения BCY9408



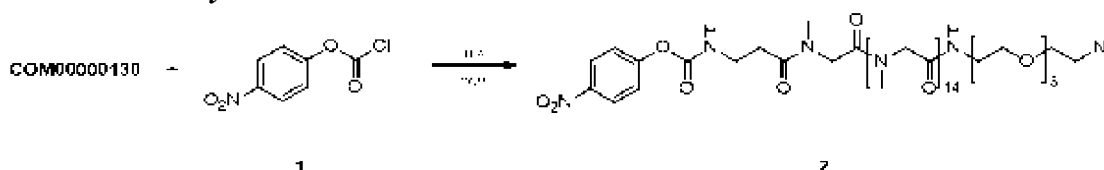
Смесь соединения 3 (7,2 мг, 2,05 мкмоль, 1,0 экв.), BCY7741 (5,0 мг, 2,19 мкмоль, 1,03 экв.) и THPTA (0,4 М, 5,1 мкл, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 5,1 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 10,2 мкл, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [MW:

5788,49 наблюдаемое m/z : 968,9 ($[M/6+H]^+$) и 1158,0 ($[M/5+H]^+$). Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ9408 (3,1 мг, 4,97e-1 мкмоль, выход 24,23%, чистота 92,87%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ9409

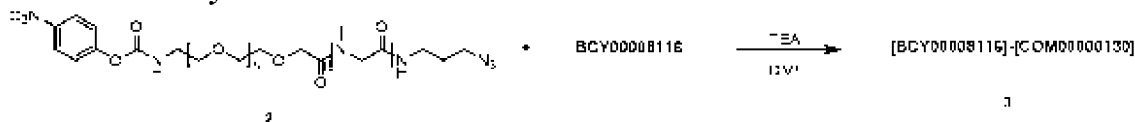


Методика получения соединения 2



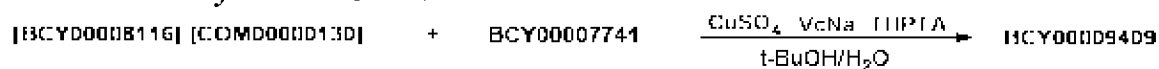
К раствору соединения 1 (30 мг, 20,78 мкмоль), COM130 (6,28 мг, 31,17 мкмоль) в DCM (3 мл) добавляли ТЕА (3,15 мг, 31,17 мкмоль, 4,34 мкл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 часа. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 1608,70, m/z : 804,8 ($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и затем лиофилизировали, получая соединение 2 (10,2 мг, неочищенное) в виде белого твердого вещества.

Методика получения соединения 3



К раствору соединения 2 (10,2 мг, 6,34 мкмоль) и ВСУ8116 (13,50 мг, 6,22 мкмоль) в DMF (2 мл) добавляли DIEA (0,8 мг, 6,22 мкмоль, 1,1 мкл, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ обнаружил желаемое m/z (MW: 3642,08, наблюдаемое m/z : 1214,4 ($[M/3+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (15,0 мг, 4,12 мкмоль, выход 62,94%, чистота 95%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ9409

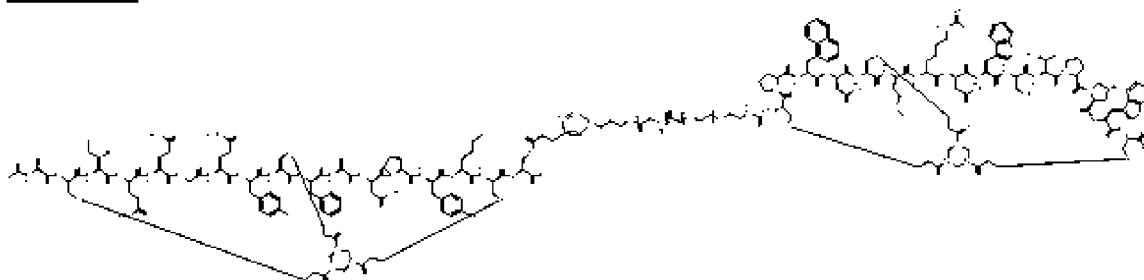


3

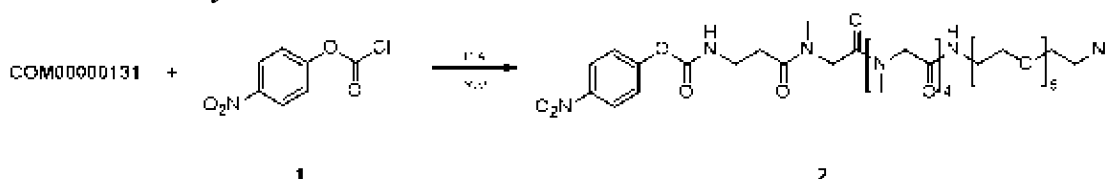
Смесь соединения 3 (15 мг, 4,12 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ7741 (10 мг, 4,38 мкмоль, 1,03 экв.) и ТНРТА (0,4 М, 10,3 мкл, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1,2 мл,

предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), а затем добавляли $CuSO_4$ (0,4 М, 10,3 мкл, 1,0 экв.) и $VcNa$ (0,4 М, 20,6 мкл, 2,0 экв.) в атмосфере N_2 . pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH_4HCO_3 (в соотношении 1:1 с $t-BuOH/H_2O$), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [MW: 5923,61, наблюдаемое m/z : 988,2 ($[M/6+H]^+$)]. Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ9409 (3,1 мг, 0,52 мкмоль, выход 12,62%, чистота 90,89%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ9410

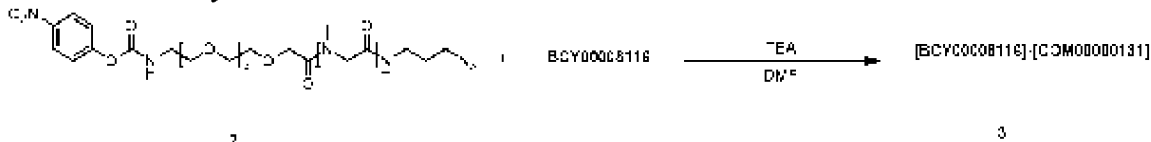


Методика получения соединения 2



К раствору COM131 (167,0 мг, 227,89 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 1 (55,0 мг, 272,87 мкмоль, 1,2 экв.) в DCM (5 мл) добавляли TEA (36,4 мг, 359,23 мкмоль, 50,0 мкл, 1,6 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 часа. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 897,93, наблюдаемый 920,3 ($[M+Na]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (35 мг, 33,74 мкмоль, выход 14,81%, чистота 86,56%) получали в виде бесцветного масла.

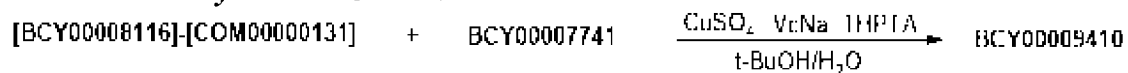
Методика получения соединения 3



К раствору соединения 2 (20 мг, 22,27 мкмоль, 1,0 экв.) и ВСУ8116 (48 мг, 22,09 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (2 мл) добавляли DIEA (8,64 мг, 66,82 мкмоль, 1,64 мкл, 3,0 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 2931,32, наблюдаемое m/z : 977,7 ($[M+H]^+$)). Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (40 мг, 13,08 мкмоль, выход

58,7%, чистота 95,82%) получали в виде белого твердого вещества.

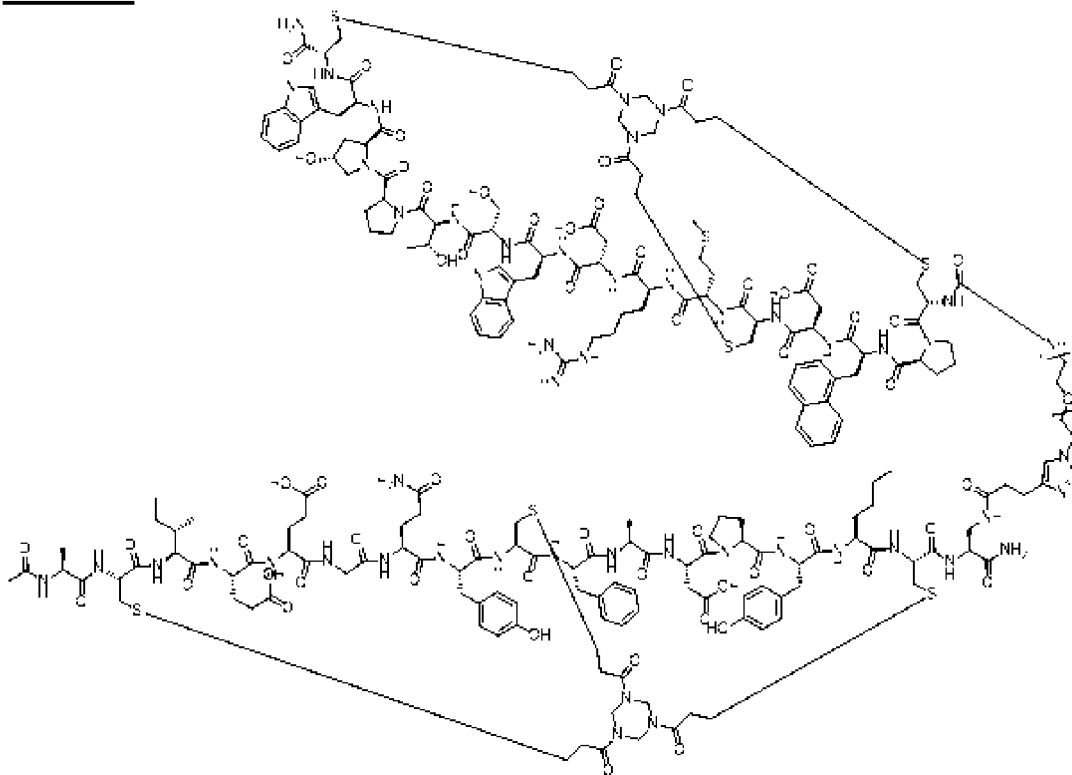
Методика получения ВСУ9410



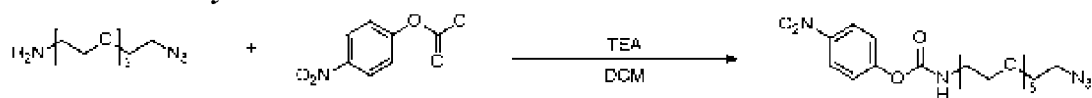
3

Смесь соединения 3 (40 мг, 13,08 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ7741 (35 мг, 15,34 мкмоль, 1,17 экв.) и ТНРТА (0,4 М, 34 мкл, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 34 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 68 мкл, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [MW: 5212,85, наблюдаемое m/z: 1043,2 ([M/5+H]⁺). Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ9410 (38,6 мг, 6,78 мкмоль, выход 49,71%, чистота 91,6%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ9411



Методика получения соединения 2



СОМ00000137

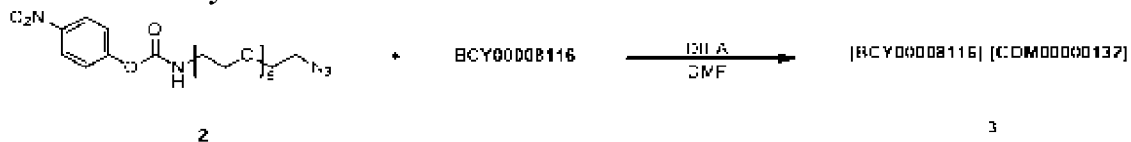
1

2

К раствору СОМ132 (5 мг, 16,32 мкмоль, 1 экв.), соединения 1 (4 мг, 19,85 мкмоль, 1,22 экв.) в DCM (5 мл) добавляли TEA (2,8 мг, 24,48 мкмоль, 3,4 мл, 1,5 экв.). Смесь

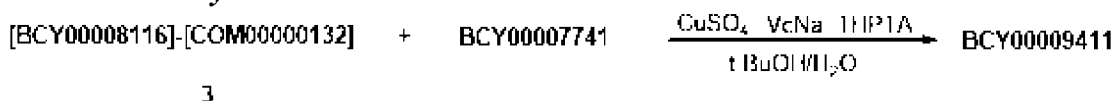
перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один пик с желаемым m/z (расчетный MW: 471,46, наблюдаемое m/z : 489,2 ($[M+NH_4]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, а затем лиофилизировали, получая соединение 2 (8 мг, неочищенное) в виде белого твердого вещества.

Методика получения соединения 3



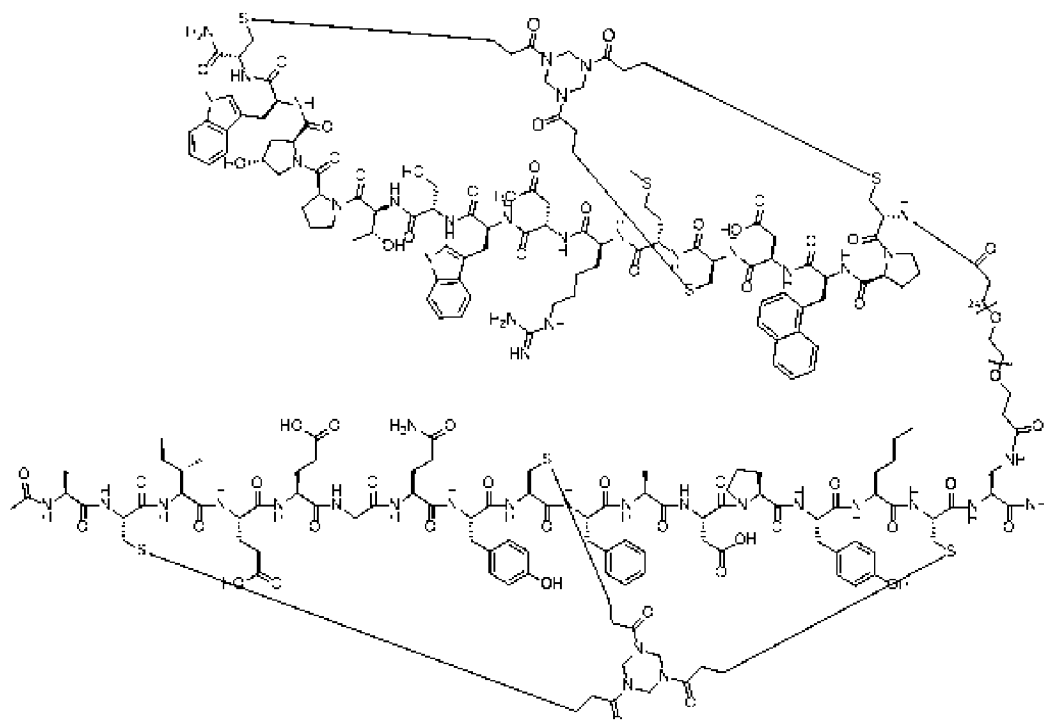
К раствору соединения 2 (3,3 мг, 6,9 мкмоль, 1,5 экв.) и BCY8116 (10,0 мг, 4,6 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (5 мл) добавляли DIEA (0,7 мг, 6,90 мкмоль, 1 мл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2504,83, наблюдаемое m/z : 1252,3 ($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (4,2 мг, 1,51 мкмоль, выход 32,78%, чистота 90%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY9411



Смесь соединения 3 (4,2 мг, 1,68 мкмоль, 1,0 экв.), BCY7741 (4,0 мг, 1,75 мкмоль, 1,05 экв.) и THPTA (0,04 М, 84 мкл, 2,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,04 М, 84 мкл, 2,0 экв.) и VcNa (0,04 М, 168 мкл, 4,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [MW: 4786,37, наблюдаемое m/z : 1596,2 ($[M/3+H]^+$), 1196,9 ($[M/4+H]^+$)]. Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). BCY9411 (4,1 мг, 0,86 мкмоль, выход 50,20%, чистота 98,26%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY9759

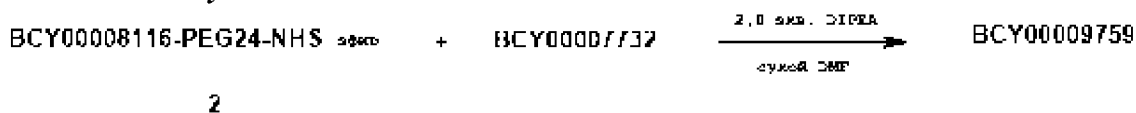


Методика получения соединения 2

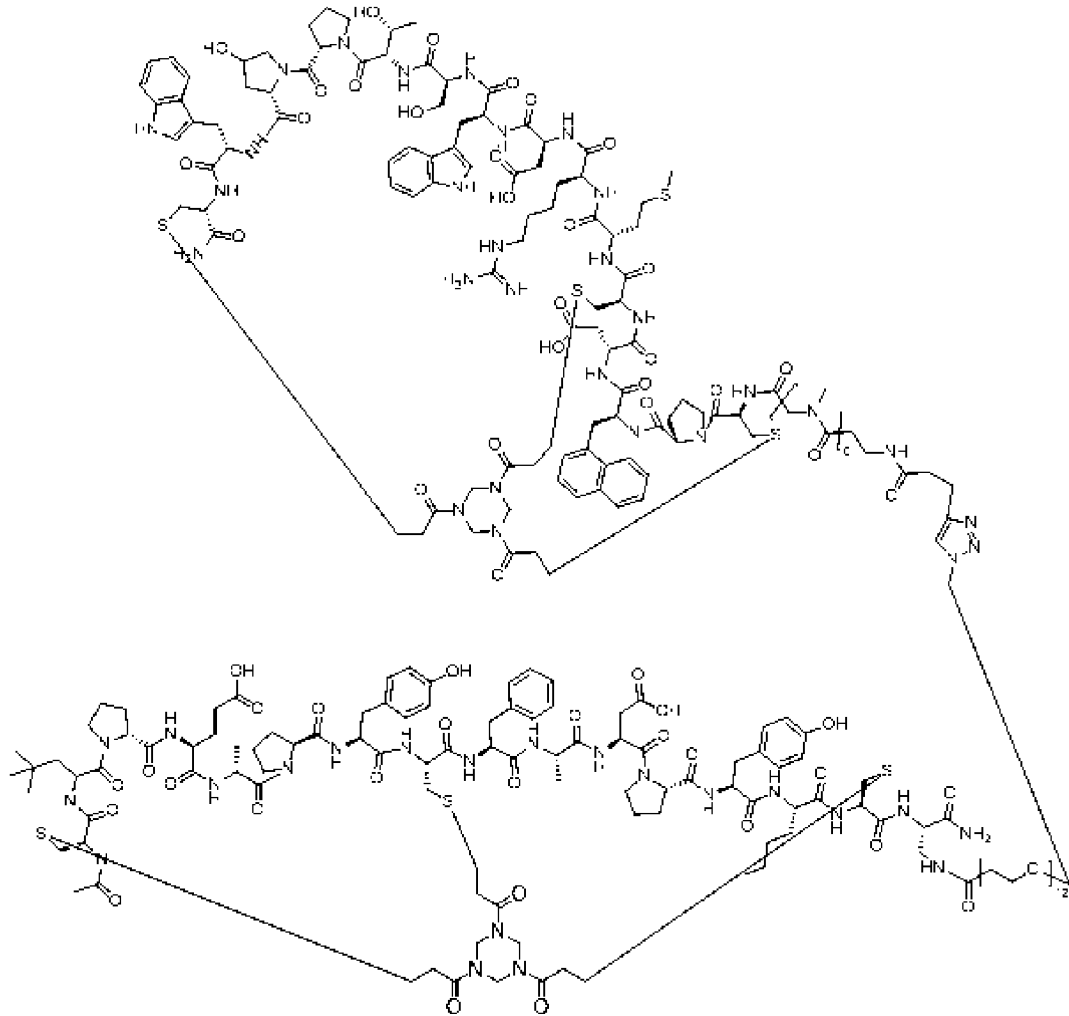
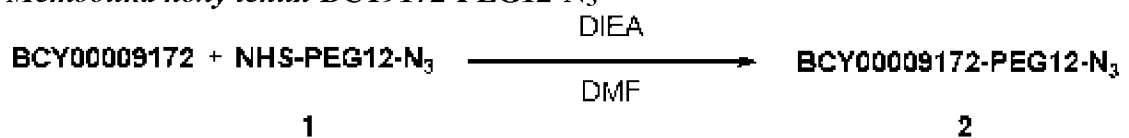


К раствору соединения 1 (5,0 мг, 3,54 мкмоль, 1,0 экв.), BCY8116 (7,7 мг, 3,54 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (3 мл) добавляли DIEA (0,9 мг, 7,07 мкмоль, 1,2 мкл, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при 0°C в течение 20 минут. ЖХ-МС анализ обнаружил массу, соответствующую соединению 2 с отщепленной группой NHS (расчетный MW: 3470,95, гидролизованный MW: 3373,81, наблюдаемое m/z: 1125,0 ([M/3+H]⁺). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении и лиофилизировали, получая соединение 2 (15 мг, неочищенное) в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY9759

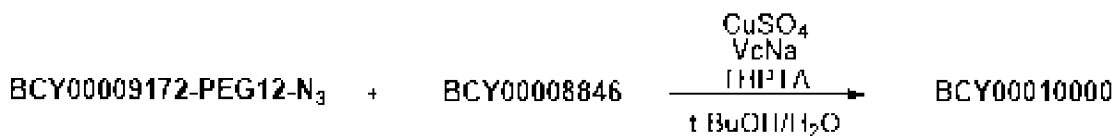


К раствору соединения 2 (20 г, 5,76 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY7732 (12,7 мг, 5,76 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (3 мл) добавляли DIEA (1,5 мг, 11,52 мкмоль, 2,0 мкл, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 5557,3, наблюдаемое m/z: 927,0 ([M/6+H]⁺) и 1112,2 ([M/5+H]⁺). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (в присутствии TFA). BCY9759 (2,3 мг, выход 6,92%, чистота 96,29%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY10000**BCY00010000****Методика получения BCY9172-PEG12-N₃**

BCY9172 (520 мг, 248,16 мкмоль, 1,0 экв.) и соединение 1 (370 мг, 499,47 мкмоль, 2,01 экв.) растворяли в DMF (5 мл), затем к смеси добавляли DIEA (48,11 мг, 372,24 мкмоль, 64,84 мл, 1,5 экв.) и перемешивали при 30°C в течение 12 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BCY9172 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2721,12, наблюдаемое m/z : 1360,9 ($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали соединение 2 (284 мг, 101,10 мкмоль, выход 40,74%, чистота 96,87%) в виде белого твердого вещества.

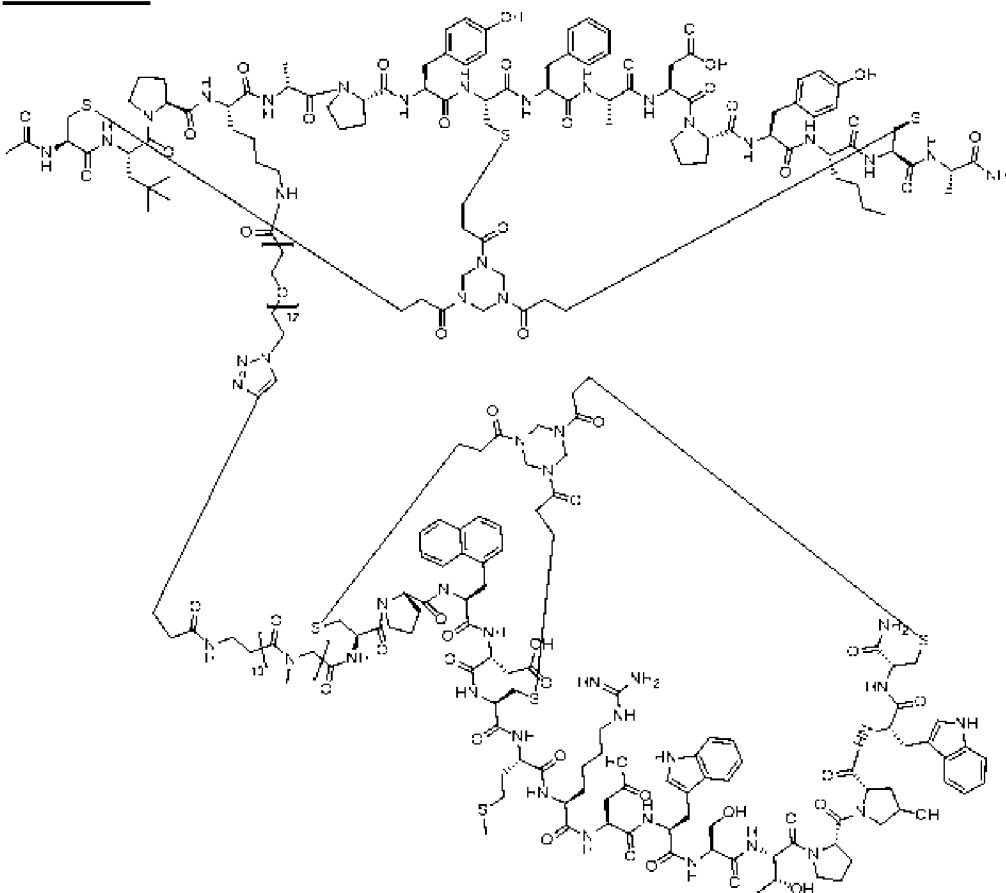
Методика получения BCY10000



2

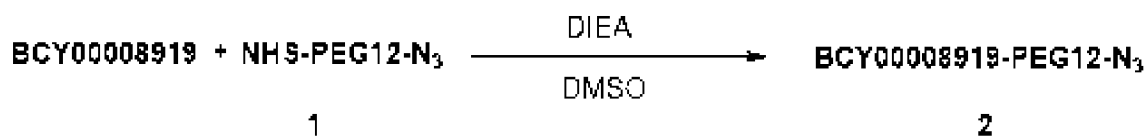
Эту реакцию проводили параллельно в двух независимых сосудах. В одном сосуде сначала растворяли соединение 2 (142 мг, 52,18 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY8846 (157 мг, 51,74 мкмоль, 1,0 экв.) в 10 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем CuSO₄ (Добавляли 0,4 М, 130,5 мкл, 1,0 экв.), VcNa (0,4 М, 261,0 мкл, 2,0 экв.) и THPTA (0,4 М, 130,5 мкл, 1,0 экв.). Наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 5755,54, наблюдаемое m/z: 959,60 ([M/6+H]⁺) и 1151,55 ([M/5+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали BCY10000 (314,9 мг, 51,99 мкмоль, выход 49,82%, чистота 95,03%) в виде белого твердого вещества.

BCY10567



BCY00010567

Методика получения BCY8919-PEG12-N₃



BCY8919 (60,0 мг, 28,85 мкмоль, 1,0 экв.) и соединение 1 (22,2 мг, 30,01 мкмоль, 1,04 экв.) растворяли в DMSO (1 мл). К раствору добавляли DIEA (5,6 мг, 43,28 мкмоль, 7,6 мкл, 1,5 экв.), а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BCY8919 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2705,16, наблюдаемое m/z: 1353,15 ([M/2+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали соединение 2 (BCY8919-PEG12-N₃, 18,5 мг, 6,77 мкмоль, выход 23,47%, чистота 99,04%) в виде белого твердого вещества.

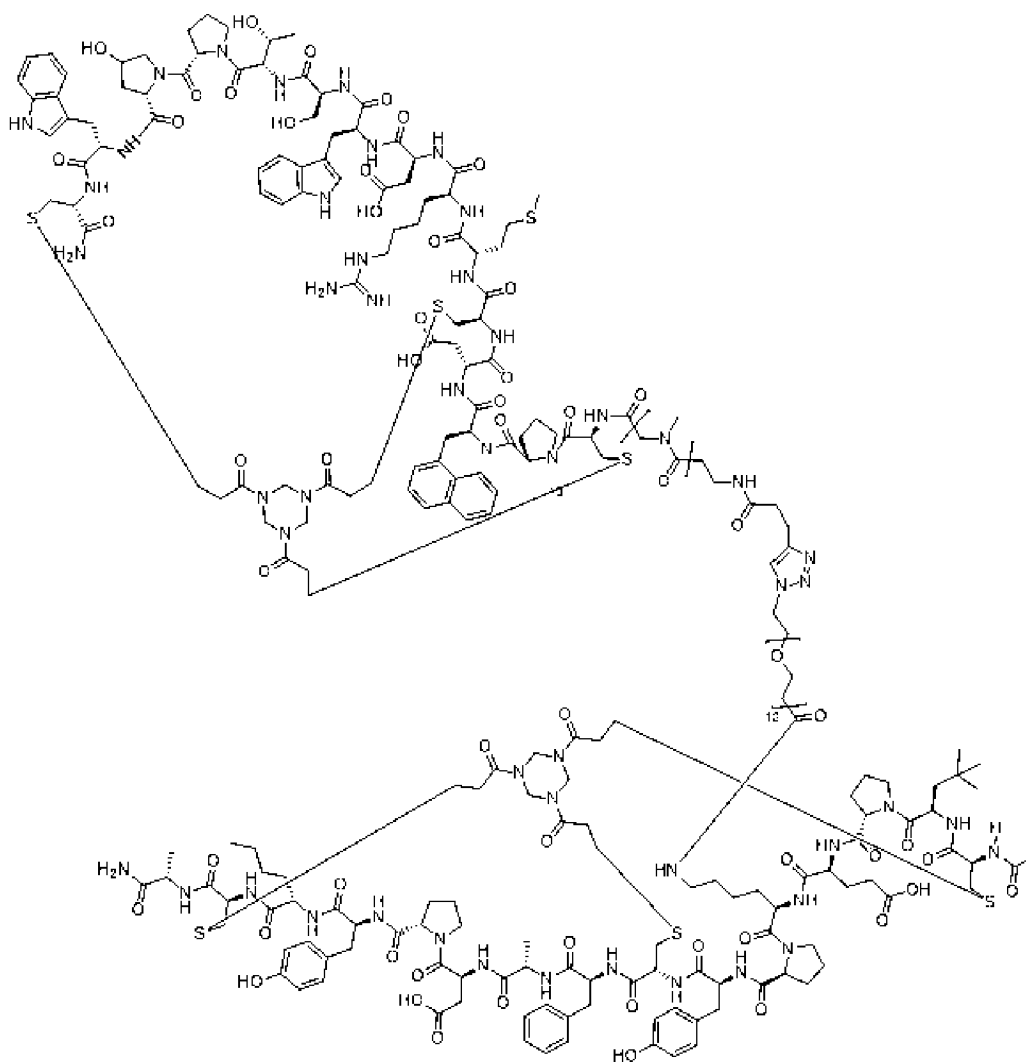
Методика получения BCY10567



Примечание: эту реакцию проводили дважды, и первая из них описана ниже.

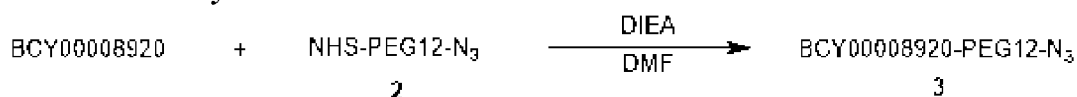
Соединение 2 (9,0 мг, 3,33 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY8846 (10,1 мг, 3,33 мкмоль, 1,0 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 8,3 мкл, 1,0 экв.), VcN (1,3 мг, 6,56 мкмоль, 2,0 экв.) и THPTA (1,4 мг, 3,22 мкмоль, 1,0 экв.). Наконец, добавляли 0,4 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 5739,58, наблюдаемое m/z: 956,75 ([M/6+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали BCY10567 (6,85 мг, 1,18 мкмоль, выход 35,48%, чистота 98,91%) в виде белого твердого вещества.

BCY10569



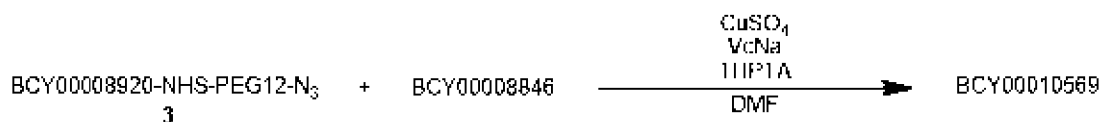
BCY00010569

Методика получения соединения 3



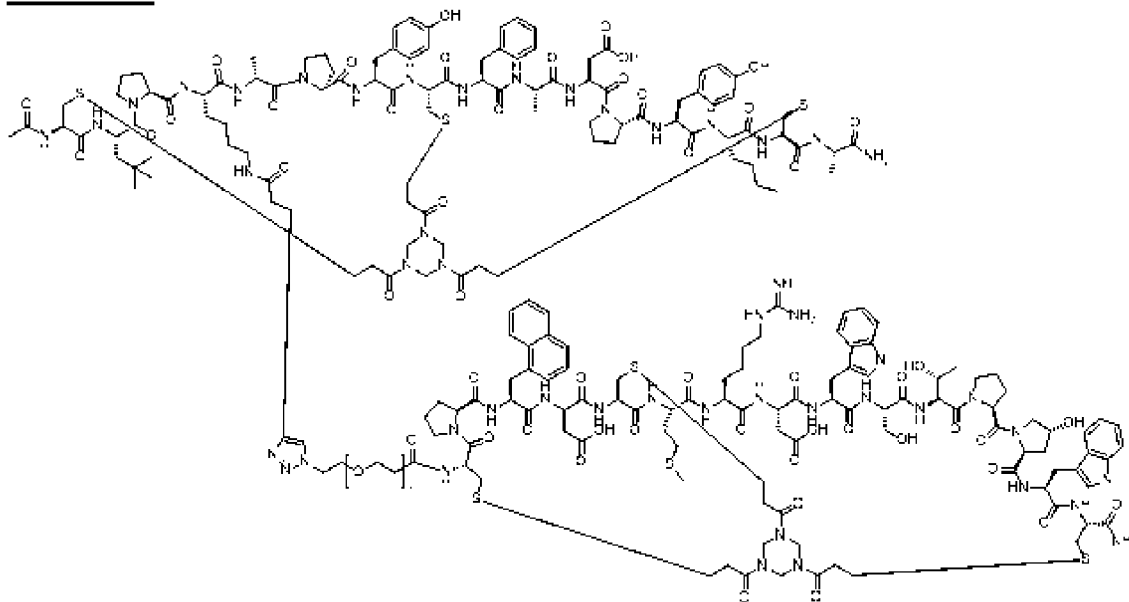
Смесь соединения BCY8920 (40,0 мг, 18,71 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 2 (16,0 мг, 21,6 мкмоль, 1,15 экв.) и DIEA (5,0 мкл, 28,0 мкмоль, 1,5 экв.) растворяли в DMF. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 1 часа до тех пор, пока ЖХ-МС анализ не показал, что был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2763,2, наблюдаемое m/z : 912,17 $[(M-28)/2+H]^+$). Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя и получения остатка с последующей очисткой с помощью препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (23,4 мг, 8,47 мкмоль, выход 45,25%, чистота 99,0%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY10569



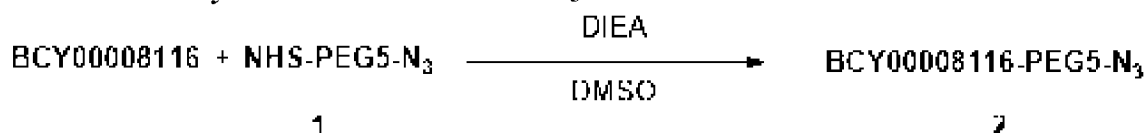
Смесь соединения 3 (5,0 мг, 1,81 мкмоль, 1,0 экв.), BCY8846 (5,8 мг, 1,9 мкмоль, 1,05 экв.) и THPTA (1,0 мг, 2,3 мкмоль, 1,3 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем CuSO₄ (0,4 М, 5,0 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 5,0 мкл, 1,0 экв.) добавляли под N₂. pH этого раствора доводили до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 5797,62, наблюдаемое m/z: 1160,7 ([M/5+H]⁺). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали BCY10569 (5,7 мг, 1,18 мкмоль, выход 52,25%, чистота 96,16%) в виде белого твердого вещества.

BCY10571



BCY00010571

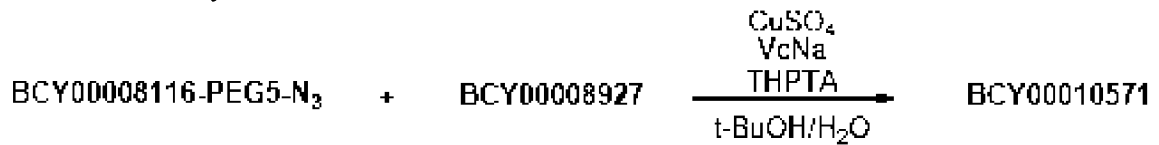
Методика получения BCY8116-PEG5-N₃



BCY8116 (60 мг, 27,62 мкмоль, 1,0 экв.) и соединение 1 (12,0 мг, 27,75 мкмоль, 1,0 экв.) сначала растворяли в DMSO (1 мл), затем к смеси добавляли DIEA (5,4 мг, 41,43 мкмоль, 7,22 мкл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 12 часов. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 2489,82, наблюдаемое m/z: 1245,1700 ([M/2+H]⁺). Реакционную смесь концентрировали при

пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (48 мг, 19,28 мкмоль, выход 69,80%, чистота 100%) получали в виде белого твердого вещества.

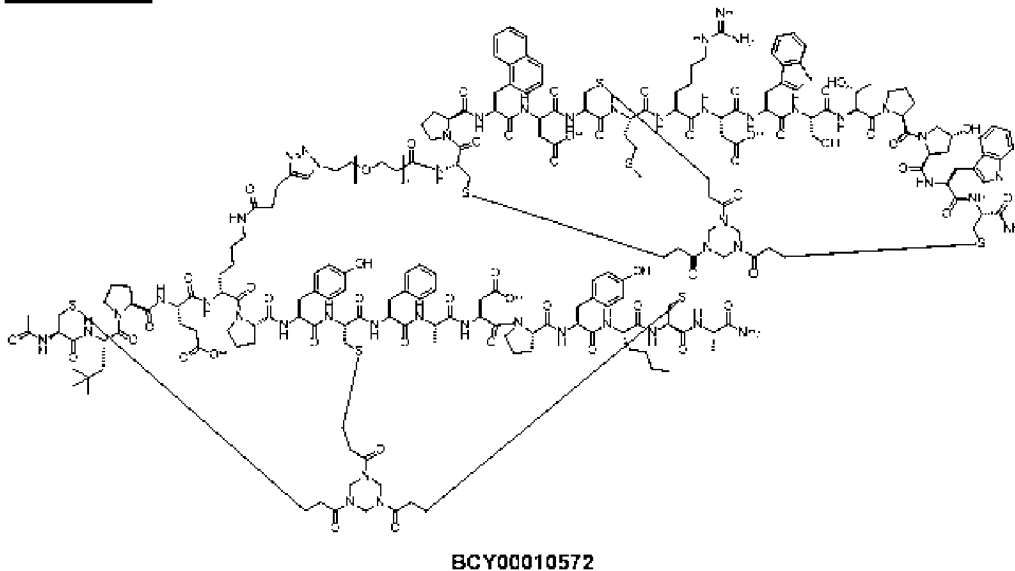
Методика получения ВСУ10571



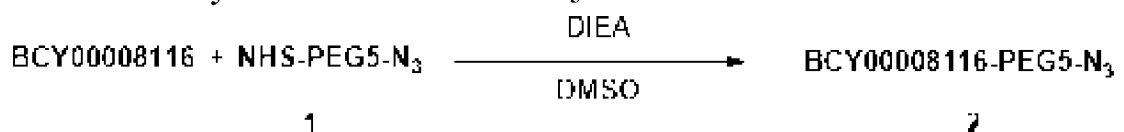
2

Эту реакцию проводили параллельно в двух независимых сосудах. Для одного сосуда соединение 2 (10 мг, 4,02 мкмоль, 1,0 экв.) и ВСУ8927 (9 мг, 4,17 мкмоль, 1,04 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 10,0 мкл, 1,0 экв.), VcNa (0,4 М, 20,1 мкл, 2,0 экв.) и THPTA (0,4 М, 10,0 мкл, 1 экв.). Наконец, добавляли 0,4 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 4 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 4649,36, наблюдаемое m/z: 1162,57 ([M/4+H]⁺), 1549,69 ([M/3+H]⁺). Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ10571 (13 мг, 2,79 мкмоль, выход 34,88%, чистота 96,48%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ10572



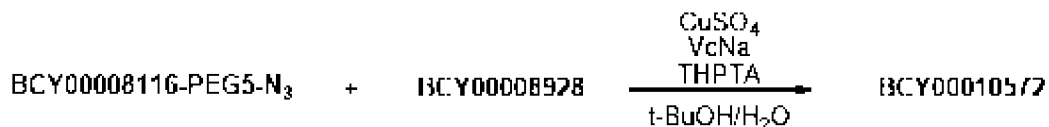
Методика получения ВСУ8116-PEG5-N₃



ВСУ8116 (60 мг, 27,62 мкмоль, 1,0 экв.) и соединение 1 (12,0 мг, 27,75 мкмоль, 1,0 экв.) сначала растворяли в DMSO (1 мл), затем к смеси добавляли DIEA (5,4 мг, 41,43

мкмоль, 7,22 мкл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 12 часов. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 2489,82, наблюдаемое m/z : 1245,1700 ($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (48 мг, 19,28 мкмоль, выход 69,80%, чистота 100%) получали в виде белого твердого вещества.

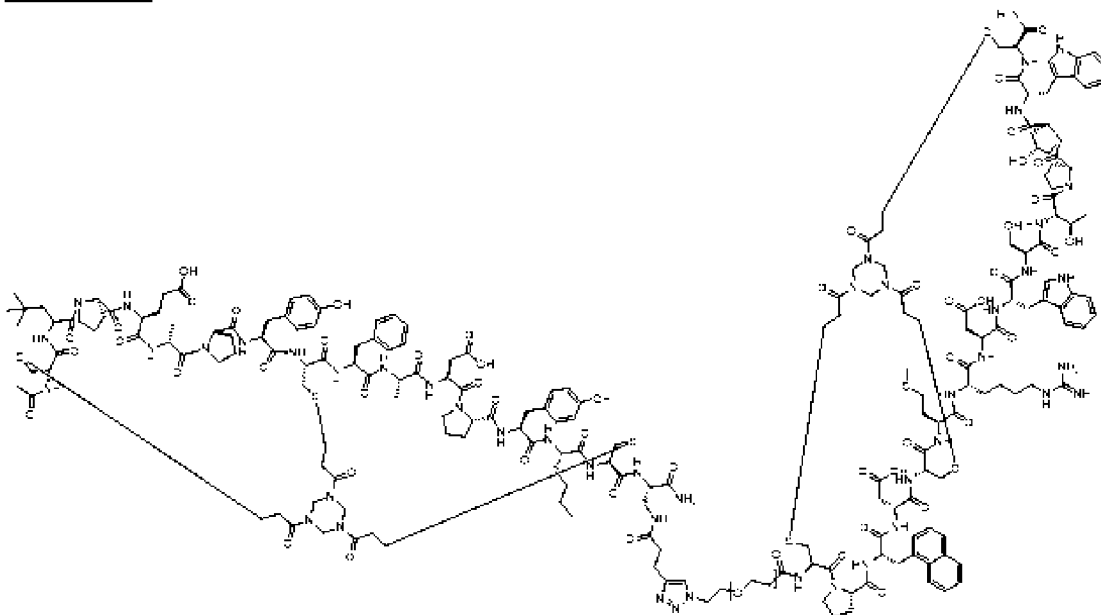
Методика получения ВСУ10572



2

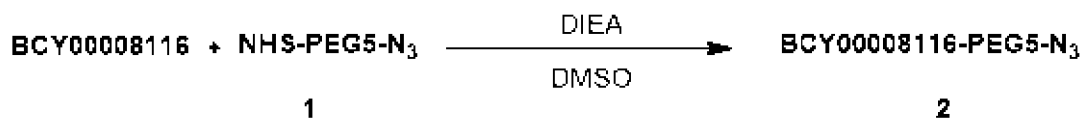
Эту реакцию проводили параллельно в двух независимых сосудах. В одном сосуде сначала растворяли соединение 2 (10 мг, 4,02 мкмоль, 1,0 экв.) и ВСУ8928 (9 мг, 4,06 мкмоль, 1,01 экв.) в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 10,1 мл, 1 экв.), VcNa (0,4 М, 20,2 мкл, 2,0 экв.) и THPTA (0,4 М, 10,1 мкл, 1,0 экв.). Наконец, добавляли 0,4 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 4 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 4707,40, наблюдаемое m/z : 1568,29 ($[M/3+H]^+$) и 1176,83 ($[M/4+H]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ10572 (21 мг, 4,46 мкмоль, выход 55,7%, чистота 97,51%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ10573



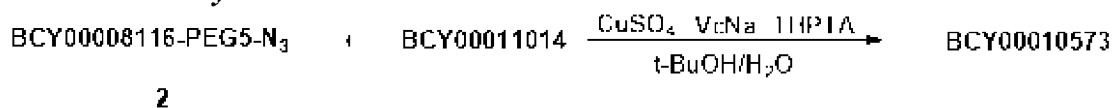
BCY00010573

Методика получения соединения 2



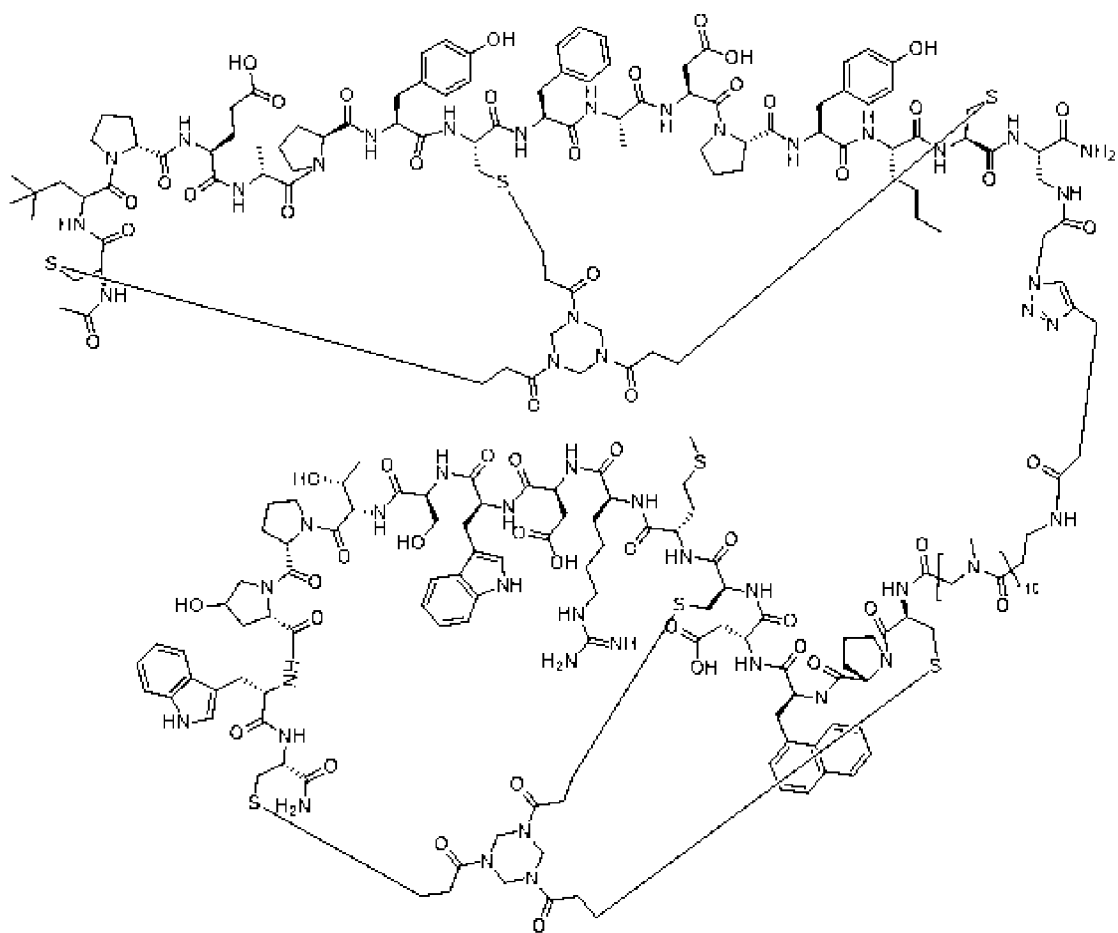
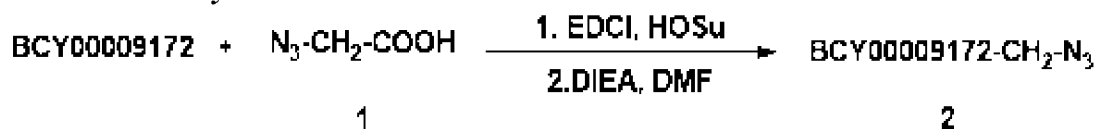
К раствору BCY8116 (35 мг, 16,11 мкмоль, 1 экв.), соединения 1 (7,00 мг, 16,19 мкмоль, 1 экв.) в DMSO (1 мл) добавляли DIEA (3,12 мг, 24,17 мкмоль, 4,21 мкл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что большая часть BCY8116 была израсходована, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2489,82, наблюдаемое m/z: 1245,37 ([M/2+H]⁺) и 830,25 ([M/3+H]⁺)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (26,8 мг, 10,76 мкмоль, выход 66,81%, чистота 100%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY10573



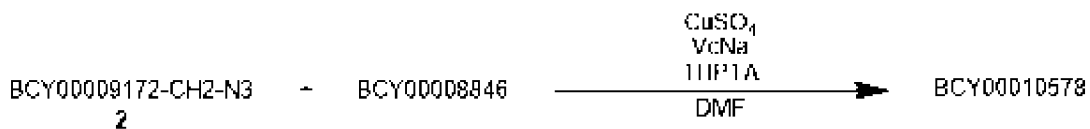
Смесь соединения 2 (15 мг, 6,02 мкмоль, 1,0 экв.), BCY11014 (13,50 мг, 6,21 мкмоль, 1,03 экв.) и ТНРТА (0,4 М, 15,1 мкл, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 15,1 мл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 30,2 мл, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [MW: 4665,32, наблюдаемое m/z: 1 167,50 ([M/4+H]⁺)]. Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). BCY10573 (11,5 мг, 2,42 мкмоль, выход 40,14%, чистота 98,11%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY10578

**BCY00010578****Методика получения соединения 2**

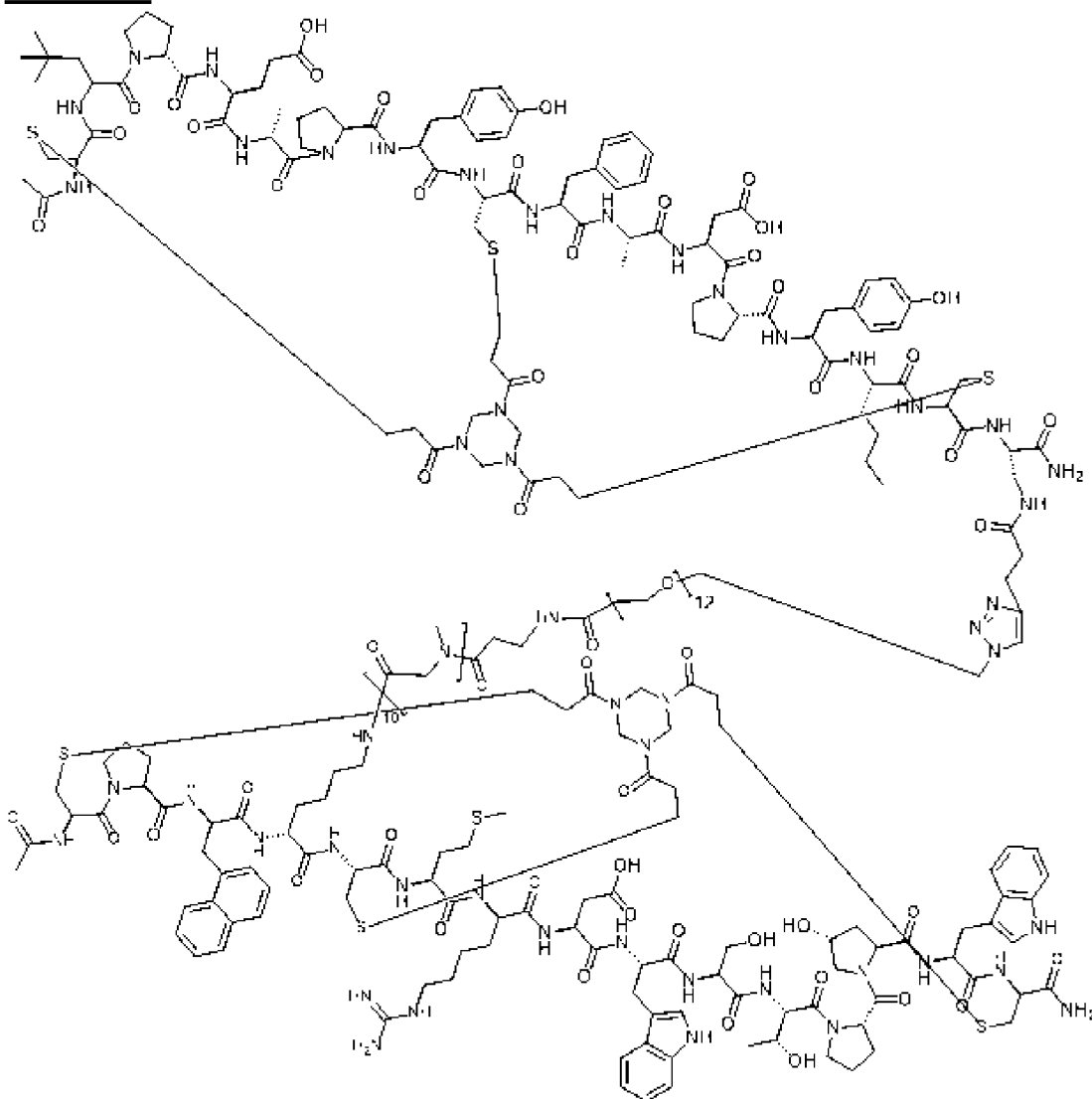
Соединение 1 (5,0 мг, 49,5 мкмоль, 1,0 экв.) сначала активировали смешиванием с EDCI (8,5 мг, 54,8 мкмоль, 1,1 экв.) и HOSu (5,7 мг, 49,5 мкмоль, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 30 мин. ТСХ показала, что соединение 1 было полностью израсходовано, и образовалось одно новое пятно. Затем к этой смеси добавляли соединение BCY9172 (80,0 мг, 38,18 мкмоль, 0,8 экв.) и DIEA (6,3 мг, 8,5 мкл, 49,5 мкмоль, 1,0 экв.) и перемешивали при 40°C в течение 1 часа до тех пор, пока ЖХ-МС анализ не показал, что был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2178,46, наблюдаемое m/z : 1089,44 ($[M/2+H]^+$)). Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя и получали остаток с последующей очисткой препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (15 мг, 6,88 мкмоль, выход 18,66%, чистота 73,3%) получали в виде белого твердого вещества.

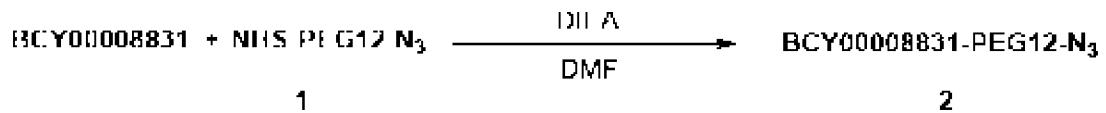
Методика получения BCY10578



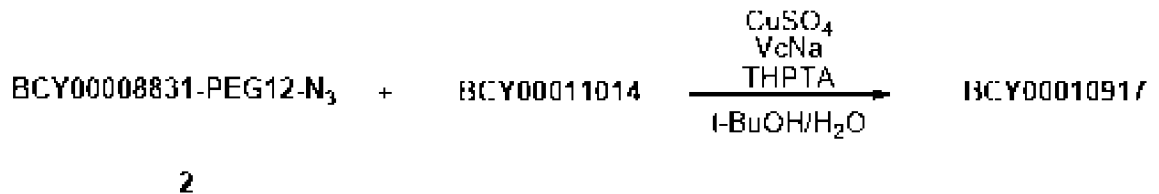
Смесь соединения **2** (9,8 мг, 4,5 мкмоль, 1,0 экв.), BCY8846 (14,0 мг, 4,6 мкмоль, 1,0 экв.) и THPTA (2,0 мг, 4,6 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в *t*-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 12 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 24 мкл, 2,0 экв.) под N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с *t*-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение **2** было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым *m/z* (расчетный MW: 5212,88, наблюдаемое *m/z*: 1304,2 ([M/4+H]⁺)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали BCY10578 (13,78 мг, 2,64 мкмоль, выход 58,66%, чистота 96,23%) в виде белого твердого вещества.

BCY10917



Методика получения ВСУ8831-PEG12-N₃

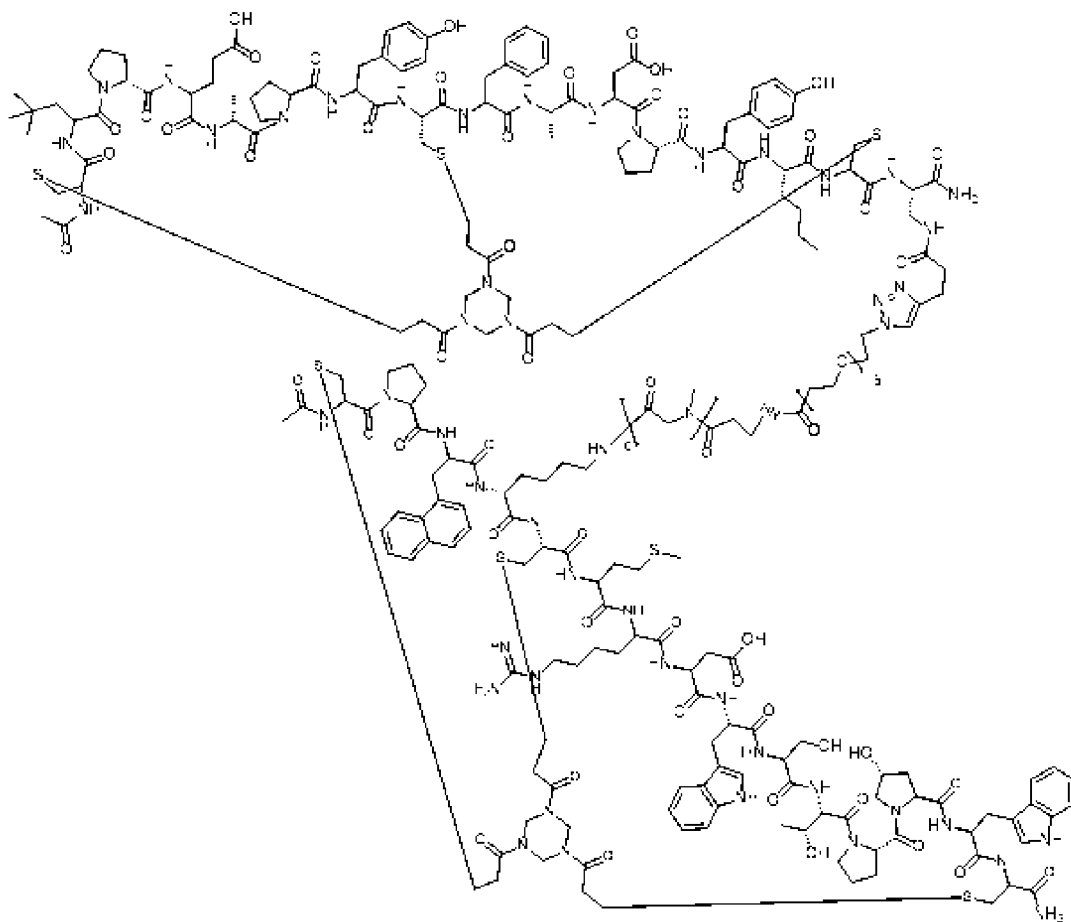
ВСУ8831 (40,0 мг, 13,29 мкмоль, 1,0 экв.) и соединение 1 (10,5 мг, 14,17 мкмоль, 1,07 экв.) растворяли в DMF (1 мл). К раствору добавляли DIEA (2,6 мг, 20,09 мкмоль, 3,5 мкл, 1,5 экв.), а затем смесь перемешивали при 30°C в течение 16 часов. ЖХ-МС анализ показал, что ВСУ8831 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 3635,16, наблюдаемое m/z: 1212,0 ([M/3+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), и соединение 2 (22,0 мг, 5,83 мкмоль, выход 43,85%, чистота 96,39%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ10917

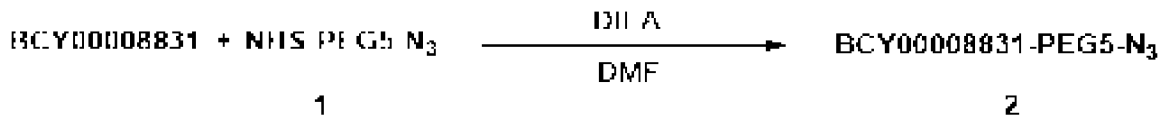
Примечание: было получено две партии, и получение первой включено в описание финального отчета.

Соединение 2 (10,0 мг, 2,75 мкмоль, 1,0 экв.) и ВСУ11014 (5,98 мг, 2,75 мкмоль, 1,0 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 13,7 мкл, 2,0 экв.), VcNa (1,1 мг, 5,55 мкмоль, 2,0 экв.) и THPTA (1,2 мг, 2,76 мкмоль, 1,0 экв.). Наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 5810,66, наблюдаемое m/z: 1163,0 ([M/5+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали ВСУ10917 (6,4 мг, 1,07 мкмоль, выход 39,03%, чистота 97,49%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ11020

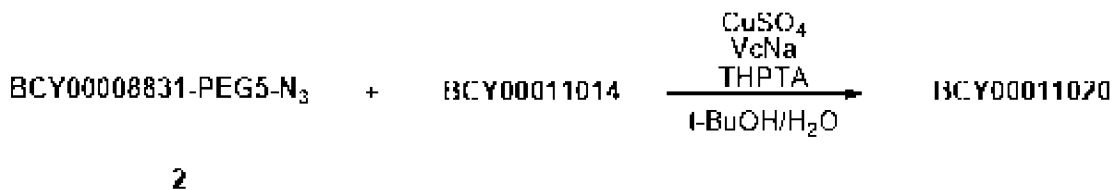


Методика получения BSY8831-PEG5-N₃



BSY8831 (25,0 мг, 8,31 мкмоль, 1,0 экв.) и соединение 1 (3,9 мг, 9,02 мкмоль, 1,09 экв.) растворяли в DMF (1 мл). К раствору добавляли DIEA (1,6 мг, 12,46 мкмоль, 2,2 мкл, 1,5 экв.), а затем смесь перемешивали при 35°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BSY8831 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 3326,79, наблюдаемое m/z: 1109,66 ([M/3+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), и соединение 2 (7,3 мг, 2,09 мкмоль, выход 25,20%, чистота 95,41%) получали в виде белого твердого вещества.

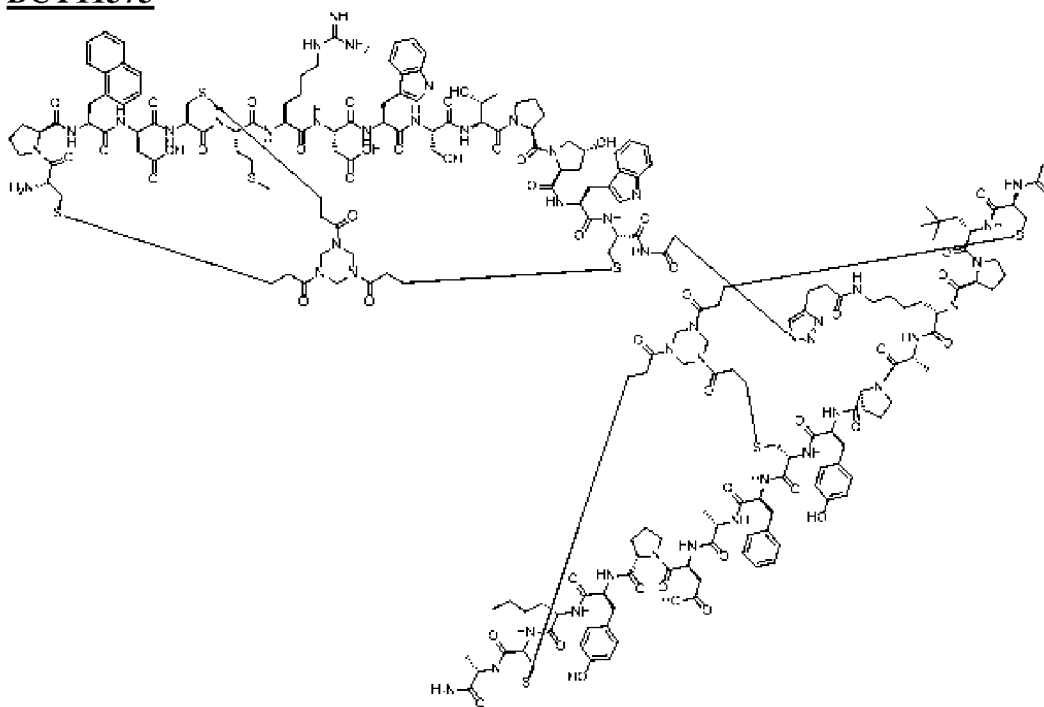
Методика получения BSY11020



Соединение 2 (7,3 мг, 2,19 мкмоль, 1,0 экв.) и BSY11014 (4,8 мг, 2,19 мкмоль, 1,0 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 5,5 мкл, 1,0 экв.), VcNa (1,0 мг, 5,05 мкмоль, 2,3 экв.) и THPTA (1,0 мг, 2,30 мкмоль, 1,0 экв.).

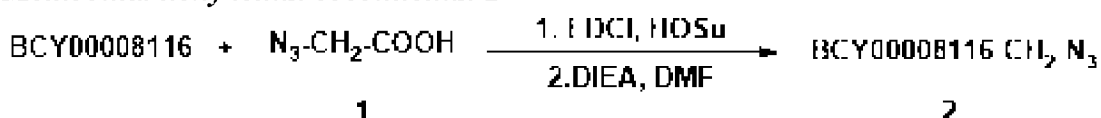
Наконец, добавляли 1 М NH_4HCO_3 , чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N_2 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 12 часов в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 5502,29, наблюдаемое m/z : 1101,74 ($[\text{M}/5+\text{H}]^+$). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали ВСУ11020 (3,3 мг, 0,577 мкмоль, выход 26,30%, чистота 96,24%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ11373



ВСУ00011373

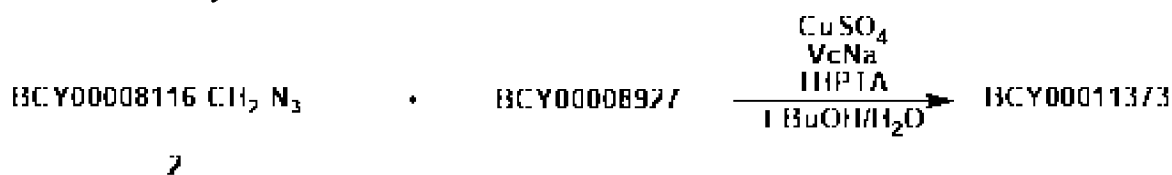
Методика получения соединения 2



К раствору соединения 1 (5,0 мг, 49,5 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли EDCI (8,5 мг, 54,8 мкмоль, 1,1 экв.) и HOSu (5,7 мг, 49,5 мкмоль, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при $25\text{-}30^\circ\text{C}$ в течение 30 минут. ТСХ показала, что соединение 1 было полностью израсходовано, и образовалось одно новое пятно. Затем к 0,3 мл этой смеси добавляли ВСУ8116 (30,0 мг, 13,81 мкмоль, 0,28 экв.) и DIEA (2,4 мкл, 13,81 мкмоль, 0,28 экв.) и перемешивали при $25\text{-}30^\circ\text{C}$ в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что ВСУ8116 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2255,53, наблюдаемое m/z : 1128,34 ($[\text{M}/2+\text{H}]^+$). Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя и получали остаток с последующей очисткой с помощью препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (21 мг, 8,9 мкмоль, выход 64,43%, чистота

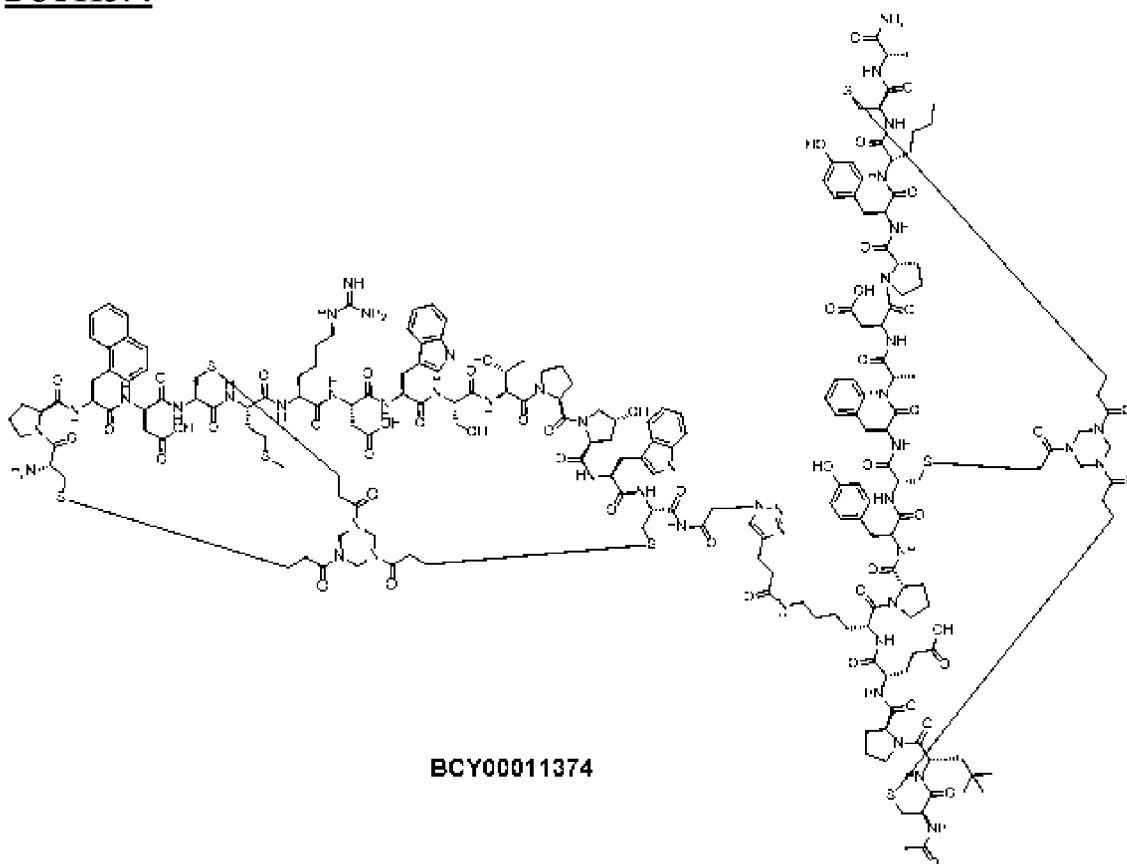
95,56%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ11373

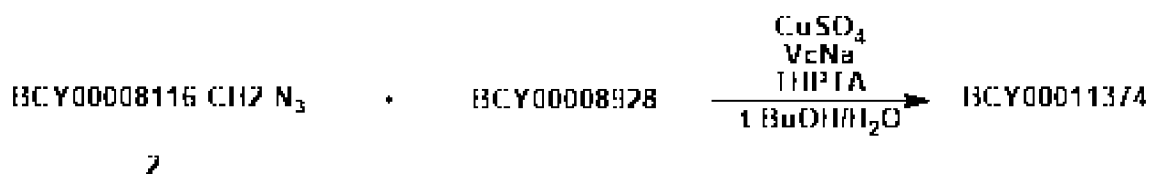


Смесь соединения 2 (5 мг, 2,22 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ8928 (4,79 мг, 2,22 мкмоль, 1,0 экв.) и ТНРТА (1,0 мг, 2,30 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем CuSO₄ (0,4 М, 5,6 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 5,6 мкл, 1,0 экв.) добавляли под N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 4415,07, наблюдаемое m/z: 1471,5 ([M/3+H]⁺ и 1103,8 ([M/4+H]⁺). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали ВСУ11373 (4,9 мг, 1,03 мкмоль, выход 46,26%, чистота 92,4%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ11374

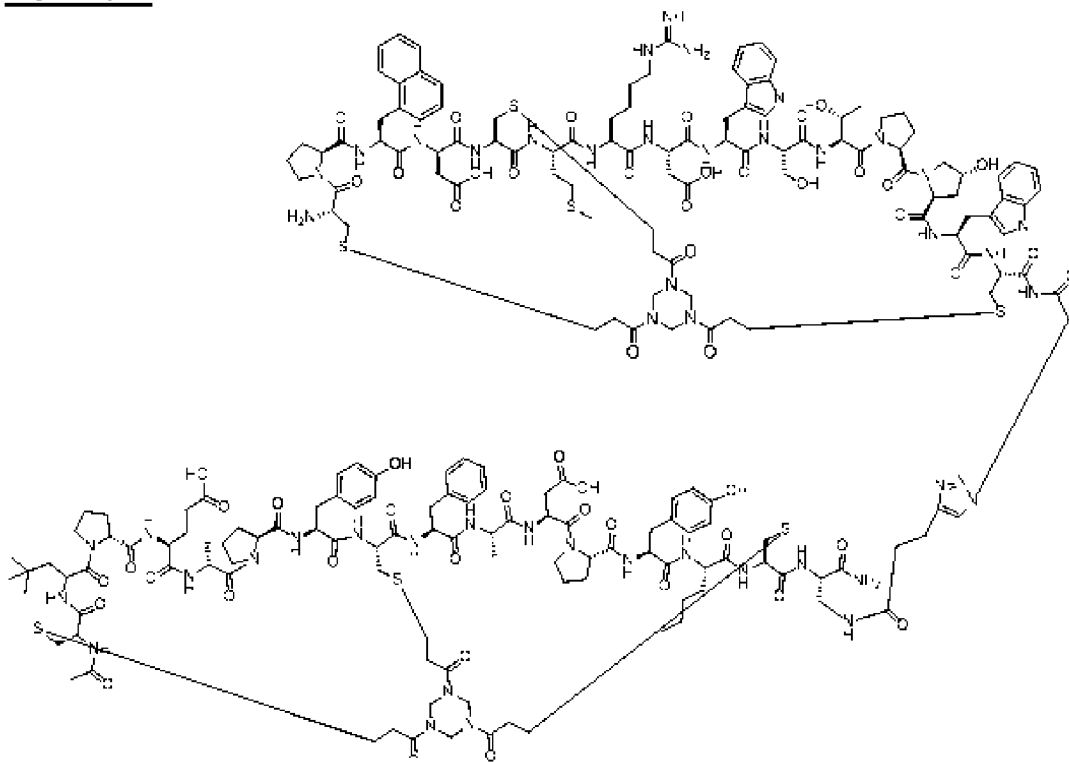


Методика получения ВСУ11374



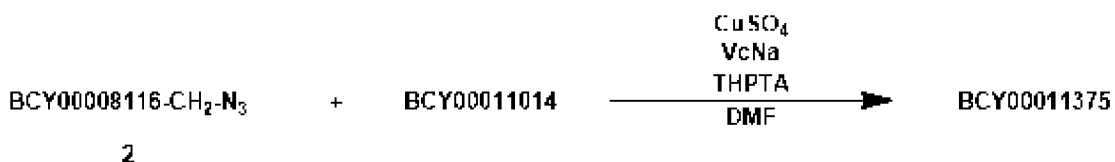
Смесь соединения 2 (которое может быть получено, как описано в методике получения BCY11373; 5 мг, 2,22 мкмоль, 1,0 экв.), BCY8928 (4,9 мг, 2,22 мкмоль, 1,0 экв.) и THPTA (1,0 мг, 2,30 экв.) мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем CuSO₄ (0,4 М, 5,6 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 5,6 мкл, 1,0 экв.) добавляли в атмосфере N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 4473,11, наблюдаемое m/z: 1491,5 ([M/3+H]⁺ и 1118,5 ([M/4+H]⁺). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали BCY11374 (4,1 мг, 1,27 мкмоль, выход 38,04%, чистота 92,0%) в виде белого твердого вещества.

BCY11375



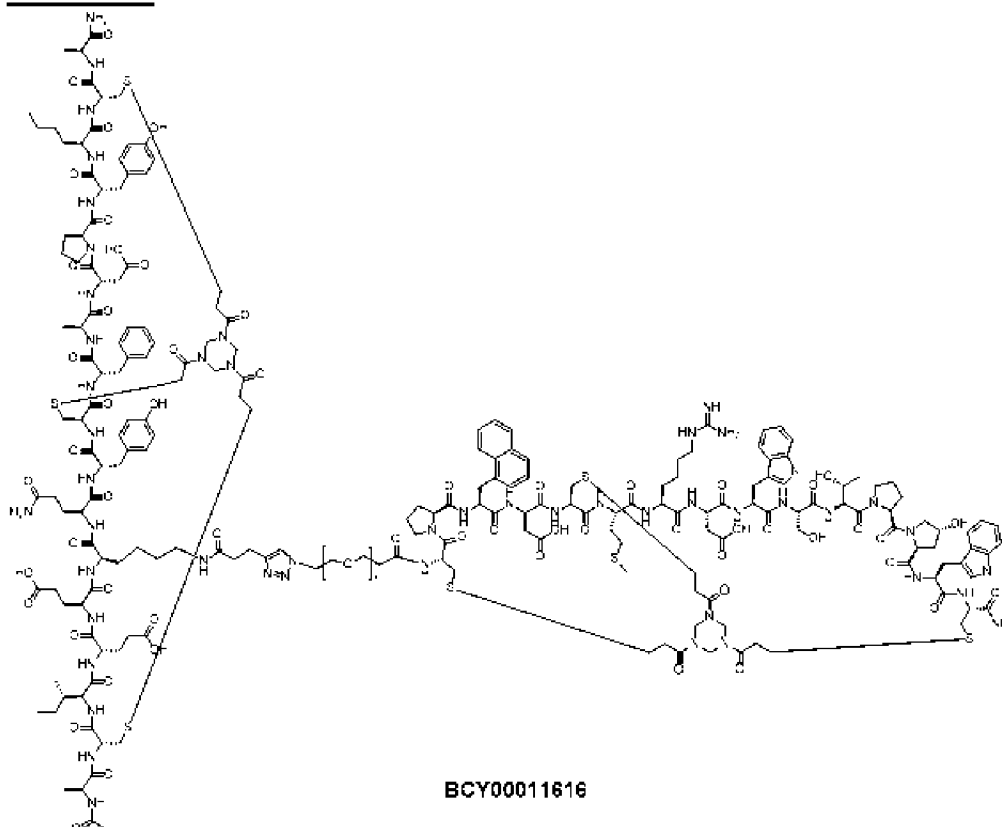
BCY00011375

Методика получения BCY11375

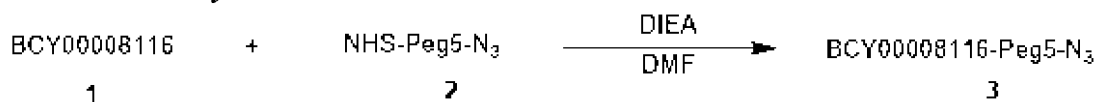


Смесь соединения 2 (которое может быть получено, как описано в ВСУ11373; 5 мг, 2,22 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ11014 (4,8 мг, 2,22 мкмоль, 1,0 экв.) и THPTA (0,5 мг, 2,30 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в *t*-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 5,6 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 5,6 мл, 1,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с *t*-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ обнаружил присутствие некоторого количества желаемого значения *m/z* (расчетный MW: 4431,03, наблюдаемое *m/z*: 1107,59 ([M/4+H]⁺ и 1477,90 ([M/3+H]⁺). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), и ВСУ11375 (6 мг, 1,31 мкмоль, выход 59,13%, чистота 96,8%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ11616



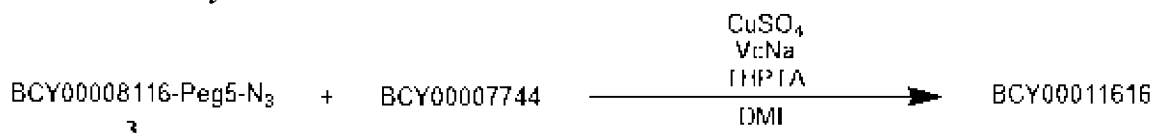
Методика получения соединения 3



Смесь соединения ВСУ8116 (30,0 мг, 13,81 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 2 (6,0 мг,

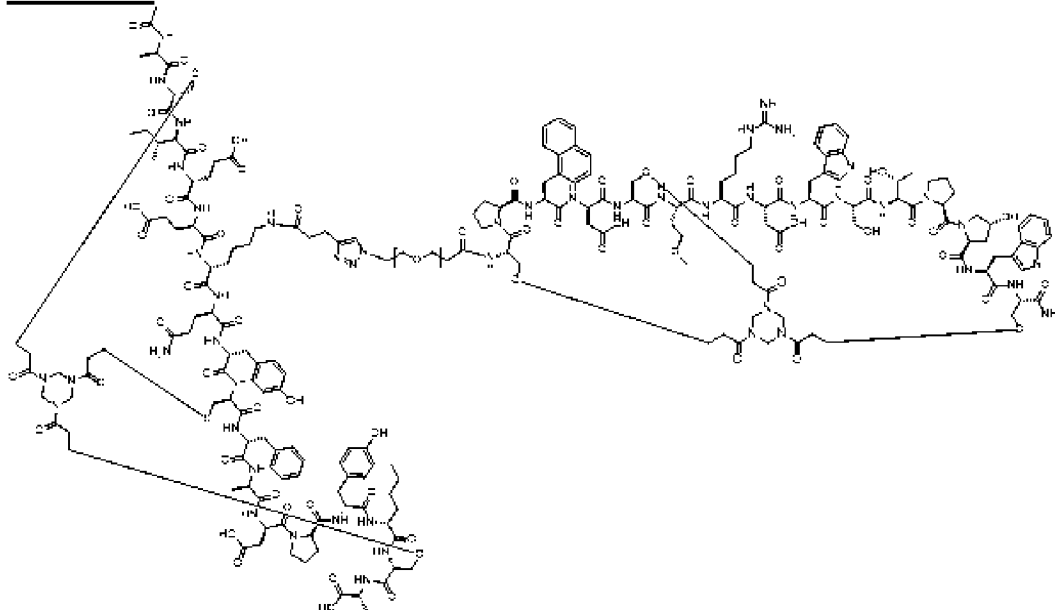
13,88 мкмоль, 1,0 экв.) и DIEA (2,4 мкл, 13,82 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в DMF. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 1 часа до тех пор, пока ЖХ-МС анализ не показал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2489,82, наблюдаемое m/z: 1245,4 ($[M/2+H]^+$). Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя и получали остаток с последующей очисткой препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 3 (27 мг, 10,29 мкмоль, выход 74,52%, 94,9% чистоты) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ11616

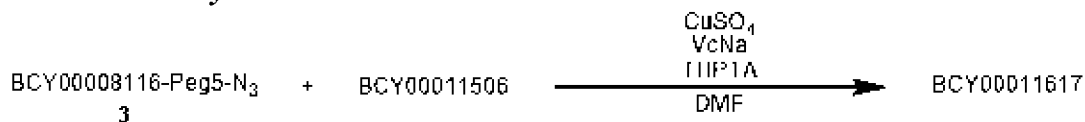


Смесь соединения 3 (5 мг, 2,01 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ7744 (5,2 мг, 2,21 мкмоль, 1,1 экв.) и THPTA (1,0 мг, 2,30 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем CuSO₄ (0,4 М, 5,0 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 5,0 мкл, 1,0 экв.) были добавлены под N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 4827,46, наблюдаемое m/z: 1207,12 ($[M/4+H]^+$). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), и получали ВСУ11616 (4,7 мг, 1,0 мкмоль, выход 48,48%, чистота 94,7%) в виде белого твердого вещества.

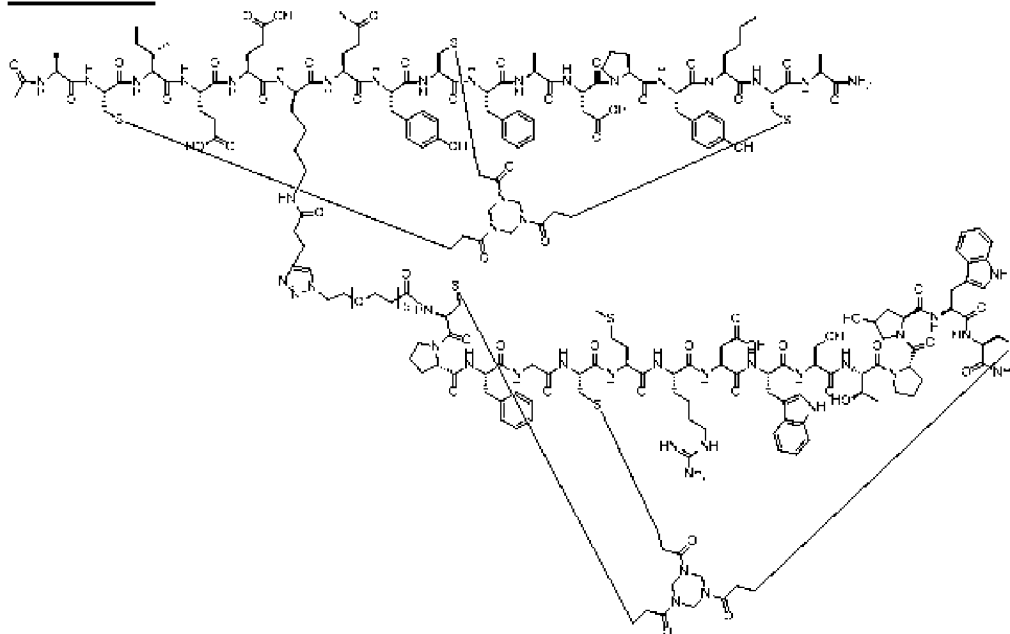
ВСУ11617



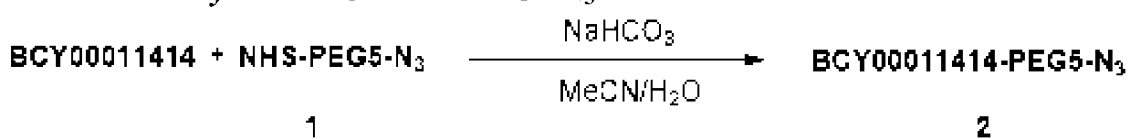
ВСУ00011617

Методика получения ВСУ11617

Смесь соединения 3 (которое может быть получено, как описано в методике получения ВСУ11616; 5 мг, 2,01 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ11506 (5,2 мг, 2,21 мкмоль, 1,1 экв.) и ТНРТА (1,0 мг, 2,30 мкмоль, 1,1 экв.) растворяли в *t*-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем CuSO₄ (0,4 М, 5,0 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 5,0 мкл, 1,0 экв.) добавляли в атмосфере N₂. pH этого раствора довели до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с *t*-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым *m/z* (расчетный MW: 4828,45, наблюдаемое *m/z*: 1206,97 ([M/4+H]⁺) и 965,91 ([M/5+H]⁺). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), и ВСУ11617 (3,2 мг, 0,63 мкмоль, выход 31,37%, чистота 95,05%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ11857

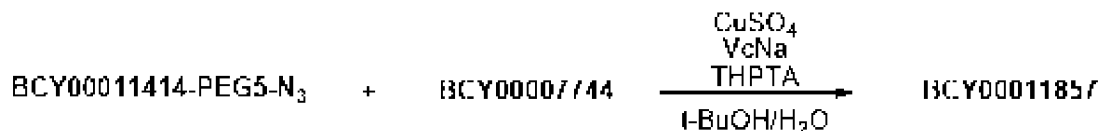
BCY00011857

Методика получения ВСУ11414-PEG5-N₃

ВСУ11414 (60,0 мг, 29,06 мкмоль, 1,0 экв.) и соединение 1 (13,0 мг, 30,06 мкмоль,

1,03 экв.) растворяли в 2 мл MeCN/H₂O (1:1). Доводили pH до 8 с помощью NaHCO₃ (0,4 М), а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2381,72, наблюдаемое m/z: 1 191,07 ([M/2+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), и соединение 2 (38,0 мг, 15,9 мкмоль, выход 54,71%, чистота 97,35%) получали в виде белого твердого вещества.

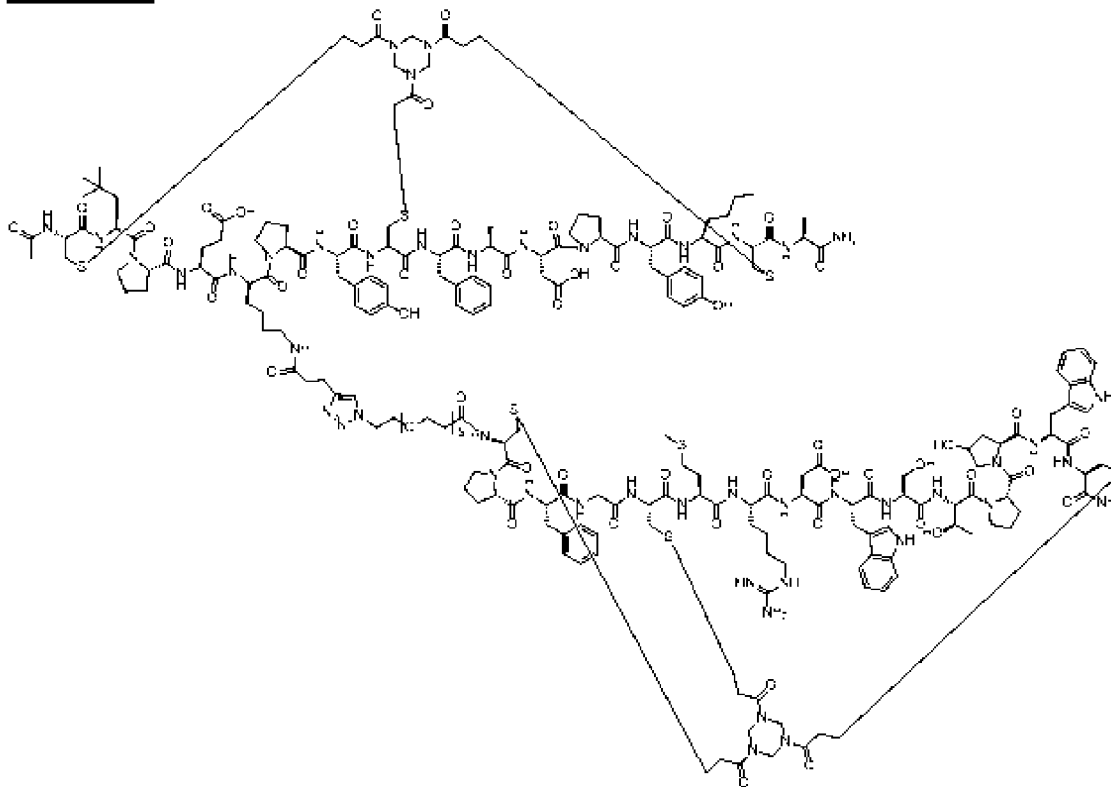
Методика получения ВСУ11857

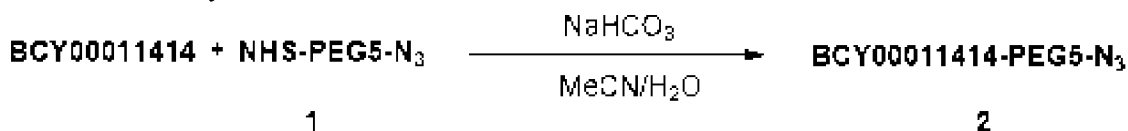


2

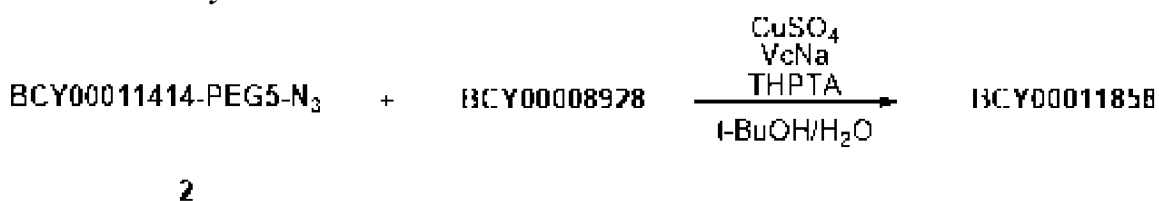
Соединение 2 (10,0 мг, 4,20 мкмоль, 1,0 экв.) и ВСУ7744 (11,5 мг, 4,92 мкмоль, 1,2 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 11,0 мл, 1,0 экв.), VcNa (2,0 мг, 10 мкмоль, 2,4 экв.) и THPTA (2,0 мг, 4,6 мкмоль, 1,1 экв.). Наконец, добавляли 0,2 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 4719,37, наблюдаемое m/z: 1180,24 ([M/4+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали ВСУ11857 (10,3 мг, 2,18 мкмоль, выход 51,90%, чистота 96,02%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ11858



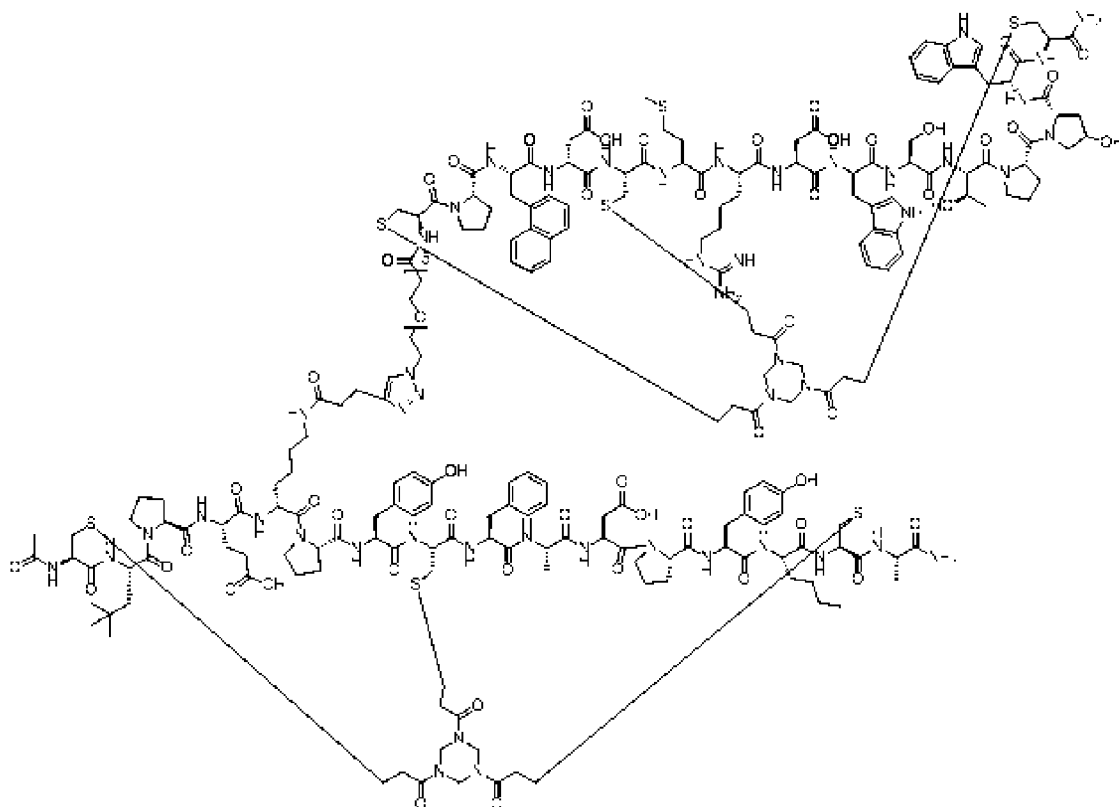
Методика получения ВСУ11414-PEG5-N₃

ВСУ11414 (60,0 мг, 29,06 мкмоль, 1,0 экв.) и соединение 1 (13,0 мг, 30,06 мкмоль, 1,03 экв.) растворяли в 2 мл MeCN/H₂O (1:1). Доводили pH до 8 с помощью NaHCO₃ (0,4 М), а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2381,72, наблюдаемое m/z: 1191,07 ([M/2+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), и соединение 2 (38,0 мг, 15,9 мкмоль, выход 54,71%, чистота 97,35%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ11858

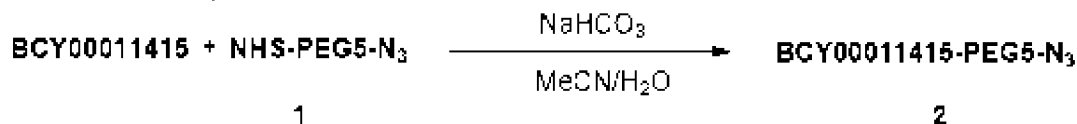
Соединение 2 (20,0 мг, 8,40 мкмоль, 1,0 экв.) и ВСУ8928 (22,0 мг, 9,92 мкмоль, 1,1 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 21,0 мл, 1,0 экв.), VcNa (4,0 мг, 20,19 мкмоль, 2,4 экв.) и THPTA (4,0 мг, 9,20 мкмоль, 1,1 экв.). Наконец, добавляли 0,4 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 4599,30, наблюдаемое m/z: 920,38 ([M/5+H]⁺), 1150,79 ([M/4+H]⁺), 1533,35 ([M/3+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали ВСУ11858 (16,9 мг, 3,67 мкмоль, выход 43,43%, чистота 99,25%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ11859



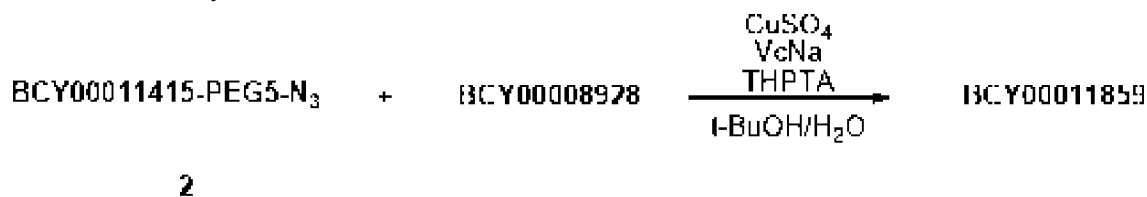
BCY00011859

Методика получения BCY11415-PEG5-N₃



BCY11415 (30,0 мг, 13,81 мкмоль, 1,0 экв.) и соединение 1 (6,0 мг, 30,06 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в 2 мл MeCN/H₂O (1:1). Доводили pH до 8 с помощью NaHCO₃ (0,4 М), а затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2489,82, наблюдаемое m/z: 1245,18 ([M/2+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), и соединение 2 (24,0 мг, 9,63 мкмоль, выход 69,7%, чистота 99,28%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY11859

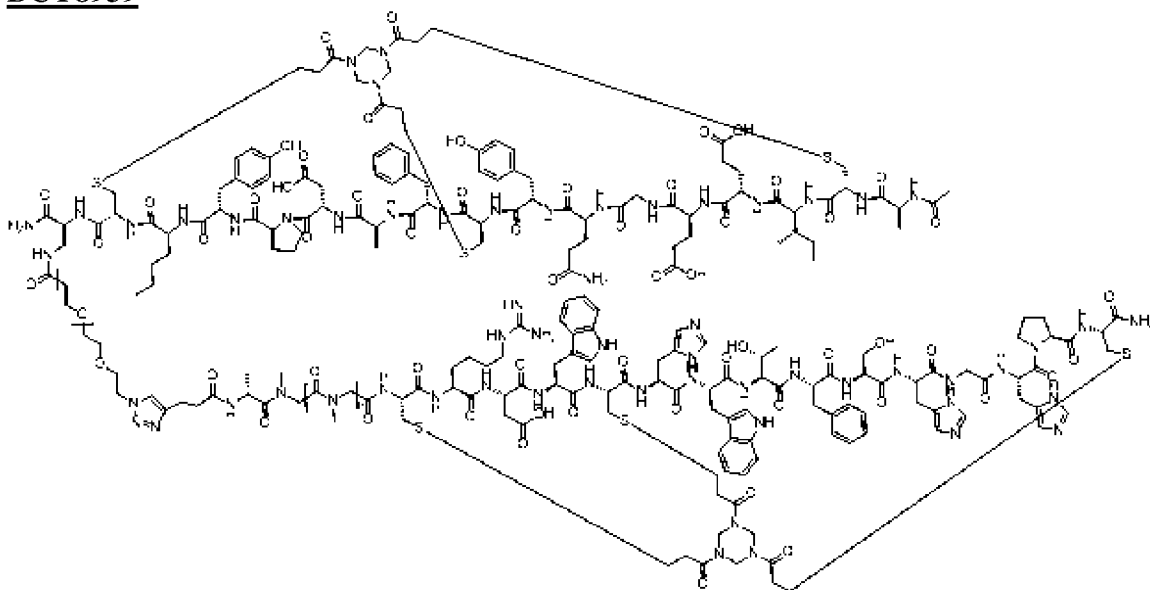


Соединение 2 (20,0 мг, 8,03 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY8928 (21,0 мг, 9,47 мкмоль, 1,1 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 21,0 мкл, 1,0 экв.), VcNa (4,0 мг, 2,5 экв.) и THPTA (4,0 мг, 1,1 экв.). Наконец, добавляли 1 М

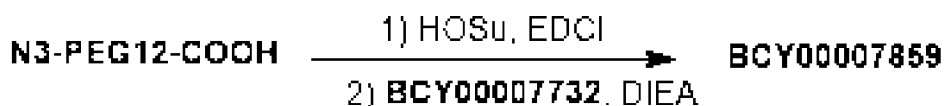
NH_4HCO_3 , чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N_2 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 16 часов в атмосфере N_2 . ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 4707,40, наблюдаемое m/z: 941,7 ($[\text{M}/5+\text{H}]^+$), 1176,9 ($[\text{M}/4+\text{H}]^+$), 1569,6 ($[\text{M}/3+\text{H}]^+$)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали BCY11859 (19,2 мг, 4,01 мкмоль, выход 49,87%, чистота 98,22%) в виде белого твердого вещества.

Пример 4: синтез связывающих PD-L1/CD137 гетеротандемных бициклических пептидов

BCY8939

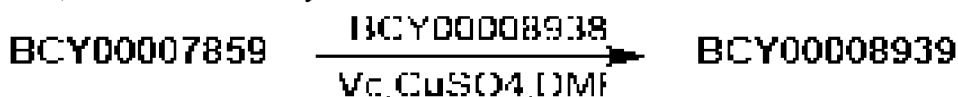


Общая методика получения BCY8939



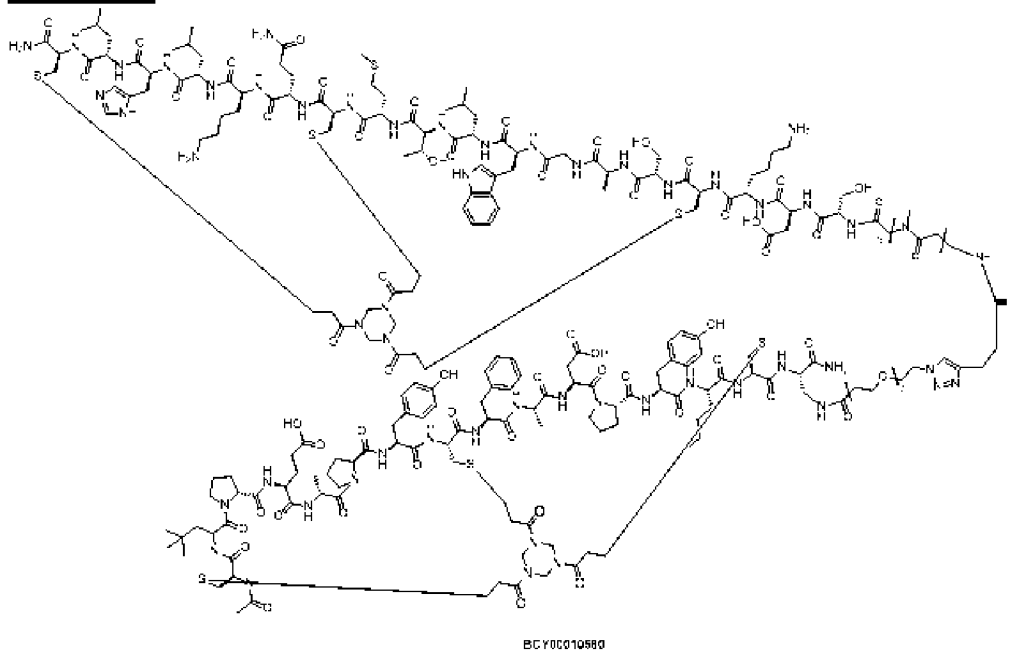
К раствору N3-PEG12-COOH (250 мг, 388 мкмоль) и HOSu (67,0 г, 583 мкмоль) в DMA (4,5 мл) и DCM (1,5 мл) добавляли EDCI (89,3 мг, 466 мкмоль) при перемешивании при 20°C в течение 16 часов. ЖХ-МС анализ показал, что желаемое промежуточное соединение образовалось полностью. BCY7732 (854,97 мг, 388,37 мкмоль, 1 экв.) и DIEA (186 мг, 1,44 ммоль, 250 мл) добавляли к смеси с дальнейшим перемешиванием при 20°C в течение дополнительных 5 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BCY7732 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемой массой. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), получая соединение BCY7859 (621 мг, 200,58 мкмоль, выход 51,65%, чистота 95%, TFA) в виде белого твердого вещества. Расчетный MW: 2817,16, наблюдаемое m/z: 942,7 ($[\text{M}/3+\text{H}]^+$).

Общая методика получения BCY8939

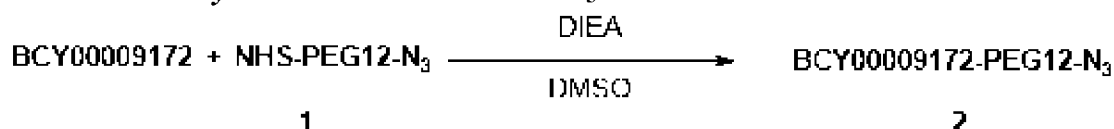


К раствору ВСУ7859 (31,1 мг, 11,0 мкмоль) и ВСУ8938 (30,0 мг, 10,0 мкмоль) в DMF (2 мл) добавляли (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидроксил-2H-фуран-5-он (1 M, 100 мкл) и CuSO_4 (1 M, 30,0 мл) при перемешивании в атмосфере азота в течение 2 часов при 20°C. ЖХ-МС анализ показал, что ВСУ7859 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемой массой. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), получая соединение ВСУ8939 (16,1 мг, 2,72 мкмоль, выход 27,1%, чистота 98,3%) в виде белого твердого вещества. Расчетный MW: 5823,49, наблюдаемое m/z: 1165,4 $[\text{M}/5+\text{H}]^+$, 971,0 $[\text{M}/6+\text{H}]^+$, 832,9 $[\text{M}/7+\text{H}]^+$.

ВСУ10580

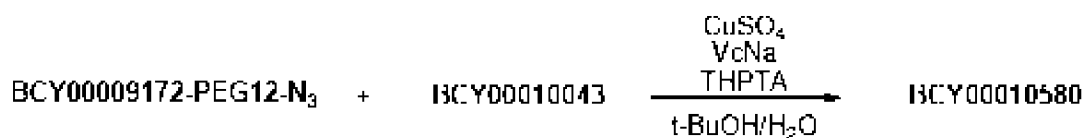


Методика получения ВСУ9172-PEG12-N₃



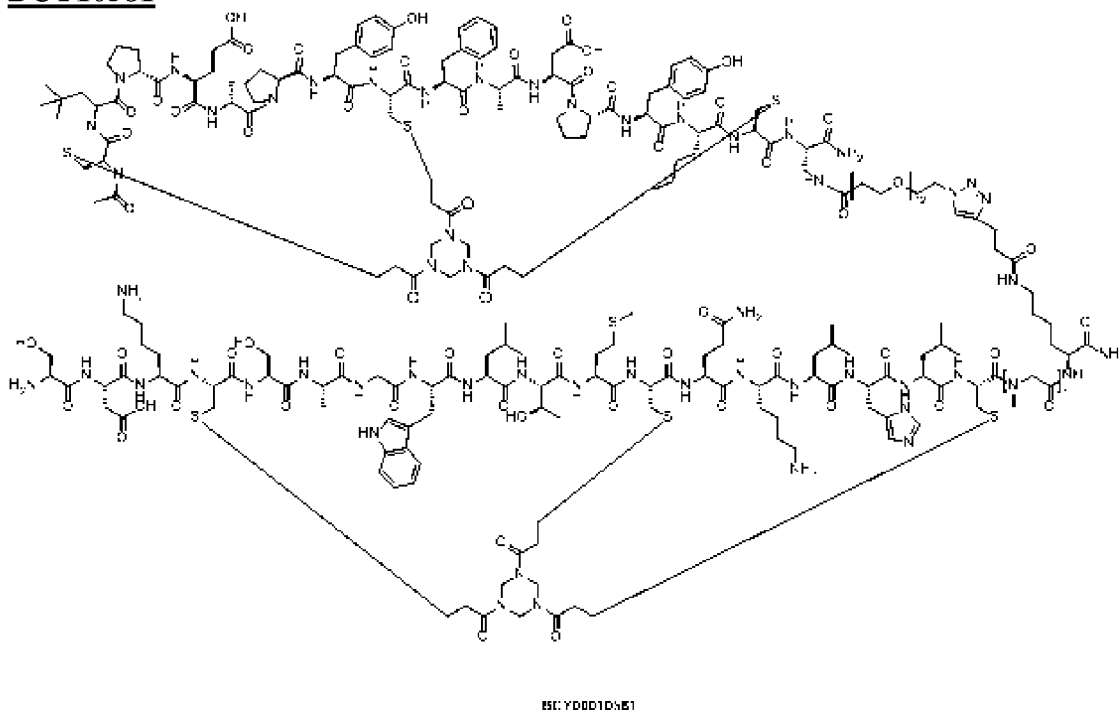
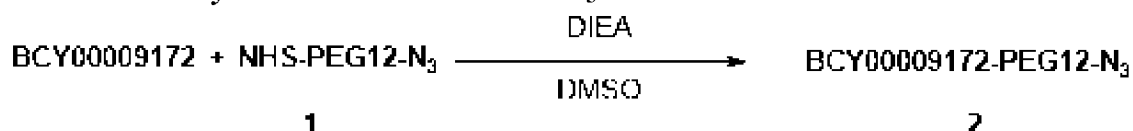
К ВСУ9172 (100,0 мг, 47,72 мкмоль, 1 экв.) и соединение 1 (40,0 мг, 54,00 мкмоль, 1,13 экв.) в DMSO (2 мл) добавляли DIEA (9,25 мг, 71,58 мкмоль, 12,47 мл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 12 часов. ЖХ-МС анализ показал, что ВСУ9172 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 2721,12, наблюдаемое m/z: 1361,07 $([(\text{M}/2+\text{H})^+])$). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя и получения остатка. Остаток затем очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях). Соединение 2 (48 мг, 17,44 мкмоль, выход 45,68%, чистота 98,87%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ10580



2

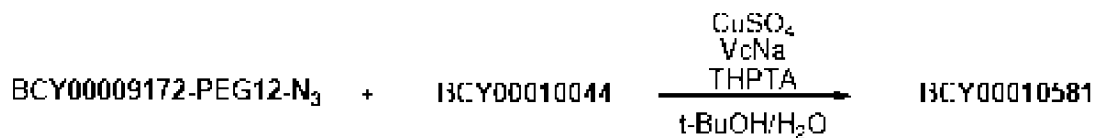
Соединение 2 (20 г, 7,35 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY10043 (23,1 мг, 7,35 мкмоль, 1,0 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 18,4 мкл, 1,0 экв.), VcNa (0,4 М, 36,8 мл, 2,0 экв.) и THPTA (0,4 М, 18,4 мл, 1,0 экв.). Наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 4 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 5855,74, наблюдаемое m/z: 976,40 ([M/6+H]⁺) и 1171,67 ([M/5+H]⁺). Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). BCY10580 (29 мг, 4,85 мкмоль, выход 65,95%, чистота 97,879%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY10581**Методика получения BCY9172-PEG12-N₃**

К BCY9172 (100 мг, 47,72 мкмоль, 1 экв.) и соединение 1 (40,00 мг, 54,00 мкмоль, 1,13 экв.) в DMSO (2 мл) добавляли DIEA (9,25 мг, 71,58 мкмоль, 12,47 мл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 12 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BCY9172 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 2721,12, наблюдаемое m/z: 1361,07 ([M/2+H]⁺)). Реакционную смесь

концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с образованием остатка. Остаток затем очищали препаративной ВЭЖХ (в нейтральных условиях). Соединение 2 (48 мг, 17,44 мкмоль, выход 45,68%, чистота 98,87%) получали в виде белого твердого вещества.

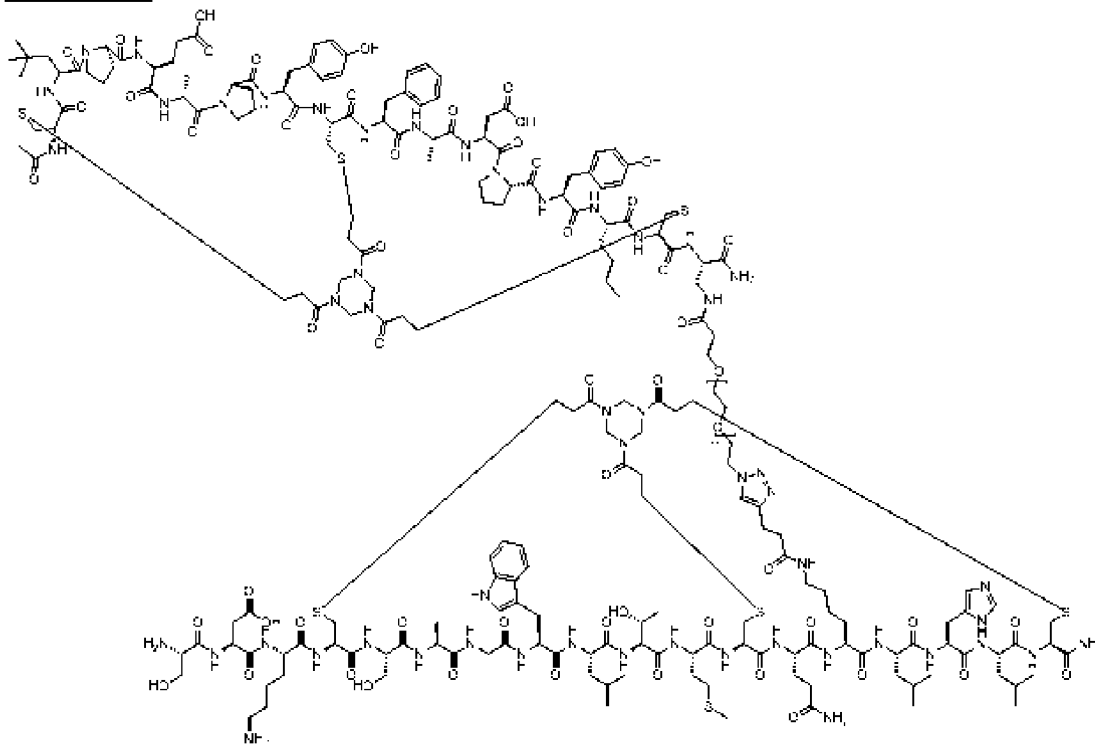
Методика получения ВСУ10581



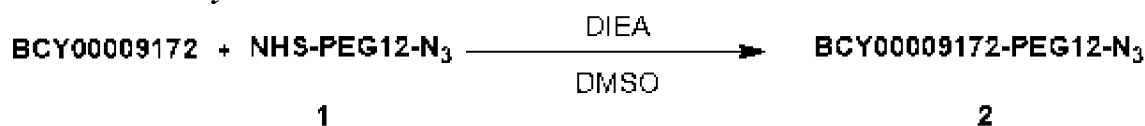
2

Соединение 2 (12 мг, 4,41 мкмоль, 1 экв.) и ВСУ10044 (14,08 мг, 4,41 мкмоль, 1 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 11,02 мкл, 1 экв.), VcNa (0,4 М, 22,05 мл, 2 экв.) и THPTA (0,4 М, 10,04 мл, 1 экв.). Наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 4 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано. и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (MW: 5912,84, наблюдаемое m/z: 985,90 ([M/6+H]⁺) и 1183,28 ([M/5+H]⁺)). Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ10581 (9,3 мг, 1,47 мкмоль, выход 33,36%, чистота 93,541%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ10582

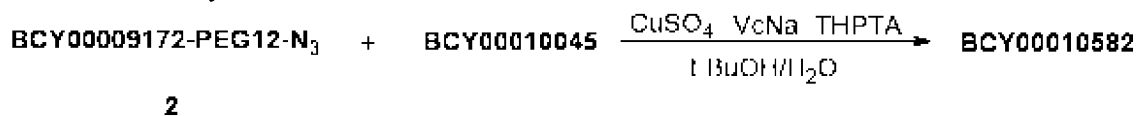


Методика получения соединения 2



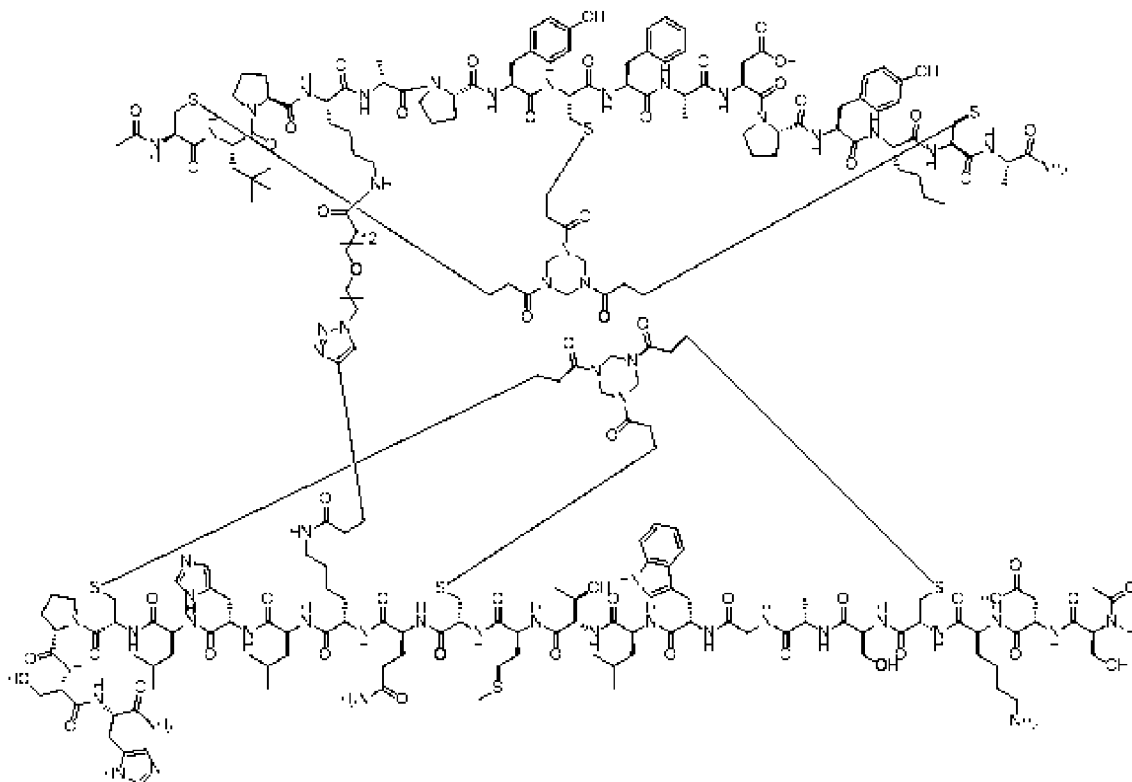
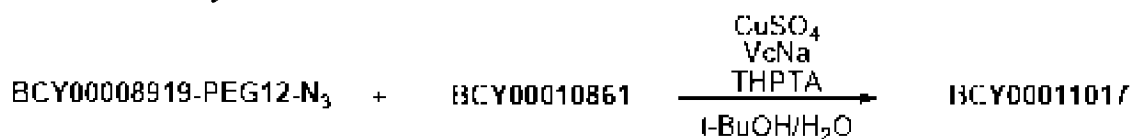
К раствору ВСУ9172 (100,0 мг, 47,7 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 1 (40,0 мг, 54,0 мкмоль, 1,13 экв.) в DMSO (2 мл) добавляли DIEA (9,2 мг, 71,6 мкмоль, 12,5 мл, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 12 часов. ЖХ-МС анализ показал, что ВСУ9172 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2721,12, наблюдаемое m/z: 1361,07 ([M/2+H]⁺)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая остаток. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (37 мг, 13,60 мкмоль, выход 28,49%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ10582



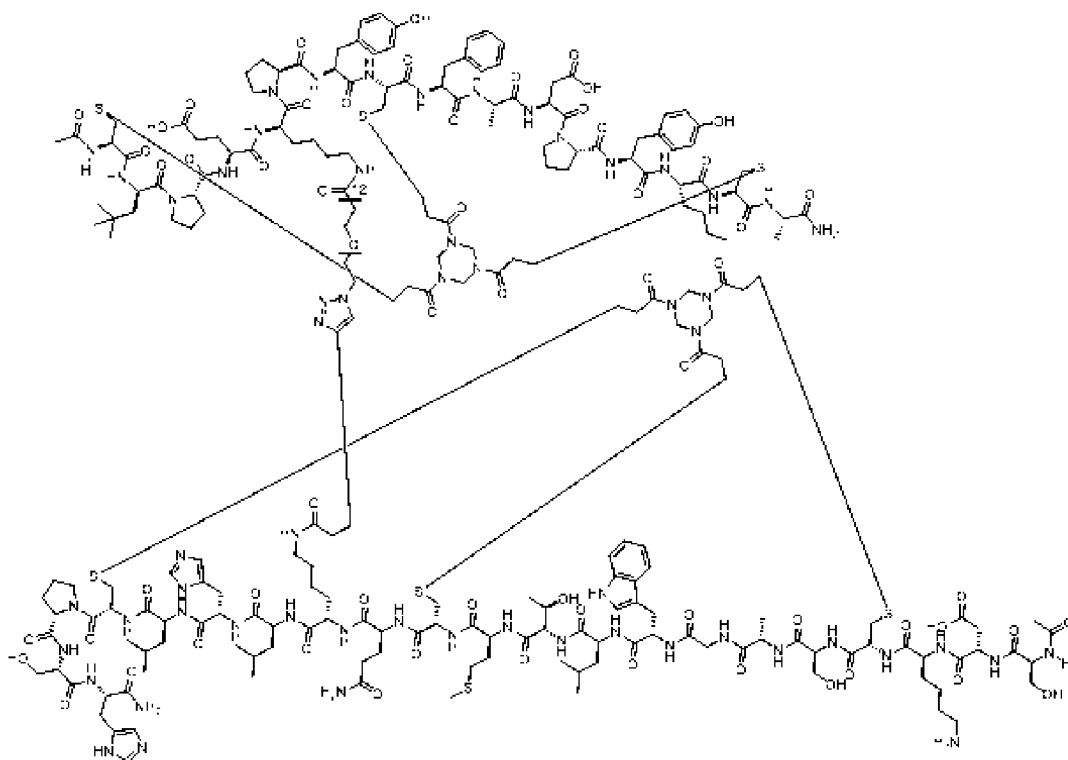
Смесь соединения 2 (16,0 мг, 5,9 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ10045 (14,0 мг, 6,0 мкмоль, 1,01 экв.) и THPTA (0,4 М, 14,7 мл, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 14,7 мл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 29,4 мл, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z [расчетный MW: 5073,89, наблюдаемое m/z: 1015,24 ([M/5+H]⁺) и 1268,97 ([M/4+H]⁺). Реакционную смесь напрямую очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). ВСУ10582 (10 мг, 1,92 мкмоль, выход 32,58%, чистота 97,21%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ11017

**BCY00011017****Методика получения BCY11017****2**

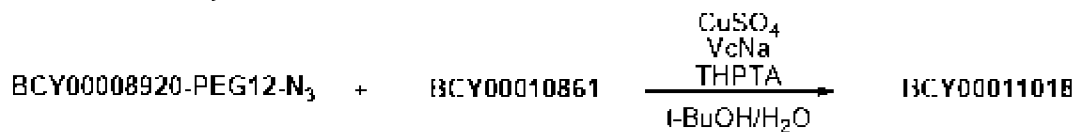
Соединение 2 (которое может быть получено, как описано в методике получения BCY10567; 7,0 мг, 2,59 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY10861 (7,03 мг, 2,59 мкмоль, 1,0 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 13,0 мкл, 2,0 экв.), VcNa (1,0 мг, 5,03 мкмоль, 2,0 экв.) и THPTA (1,1 мг, 2,53 мкмоль, 1,0 экв.). Наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 35°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 5421,30, наблюдаемое m/z: 1084,7 ([M/5+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали BCY11017 (6,6 мг, 1,17 мкмоль, выход 45,24%, чистота 96,16%) в виде белого твердого вещества.

BCY11018



BCY00011018

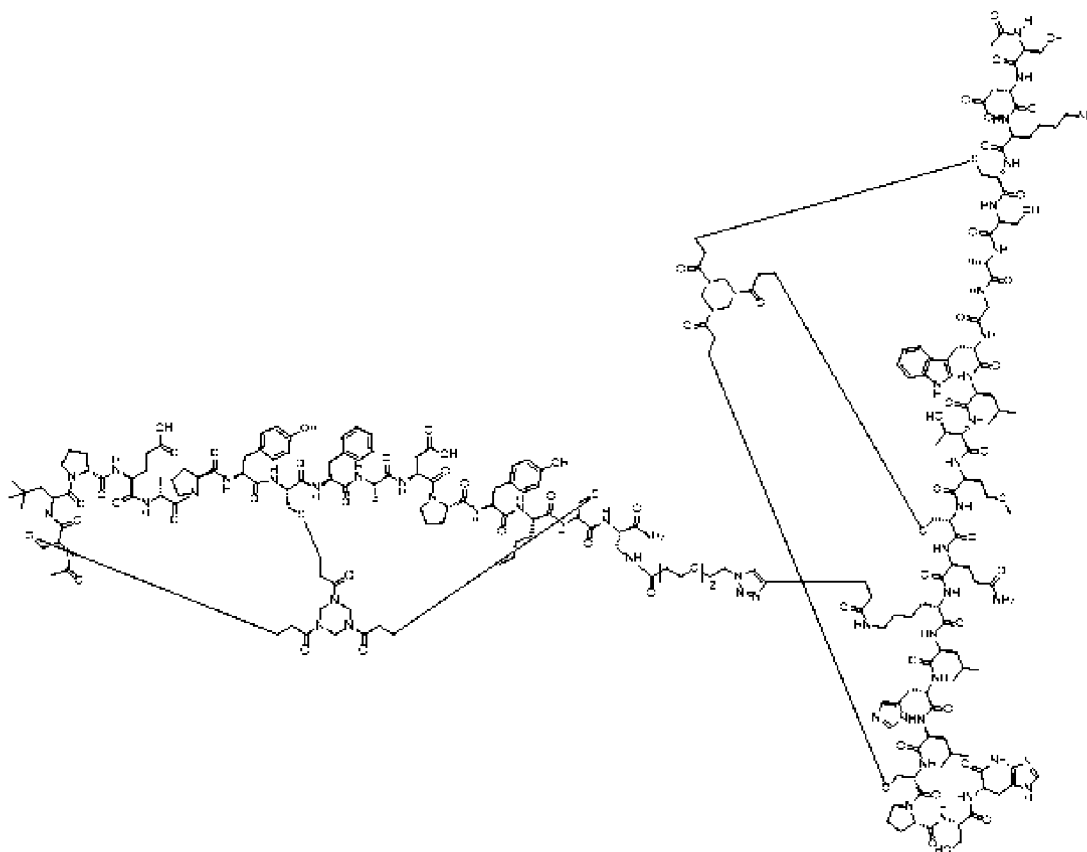
Методика получения BCY11018



2

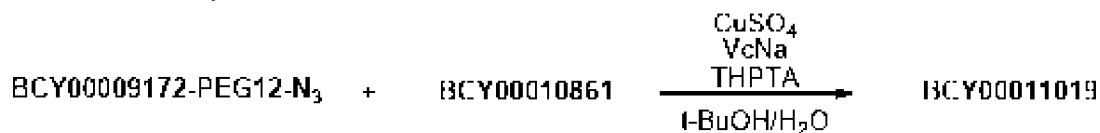
Соединение 2 (которое может быть получено, как описано в методике получения BCY10570; 6,0 мг, 2,17 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY10861 (5,9 мг, 2,17 мкмоль, 1,0 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 11,0 мкл, 2,0 экв.), VcNa (1,0 мг, 2,3 экв.) и THPTA (1,1 мг, 1,0 экв.). Наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 35°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым значением m/z (расчетный MW: 5479,34, наблюдаемое m/z: 1096,40 ([M/5+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали BCY11018 (2,3 мг, 0,40 мкмоль, выход 18,31%, чистота 94,73%) в виде белого твердого вещества.

BCY11019



ВСУ00011019

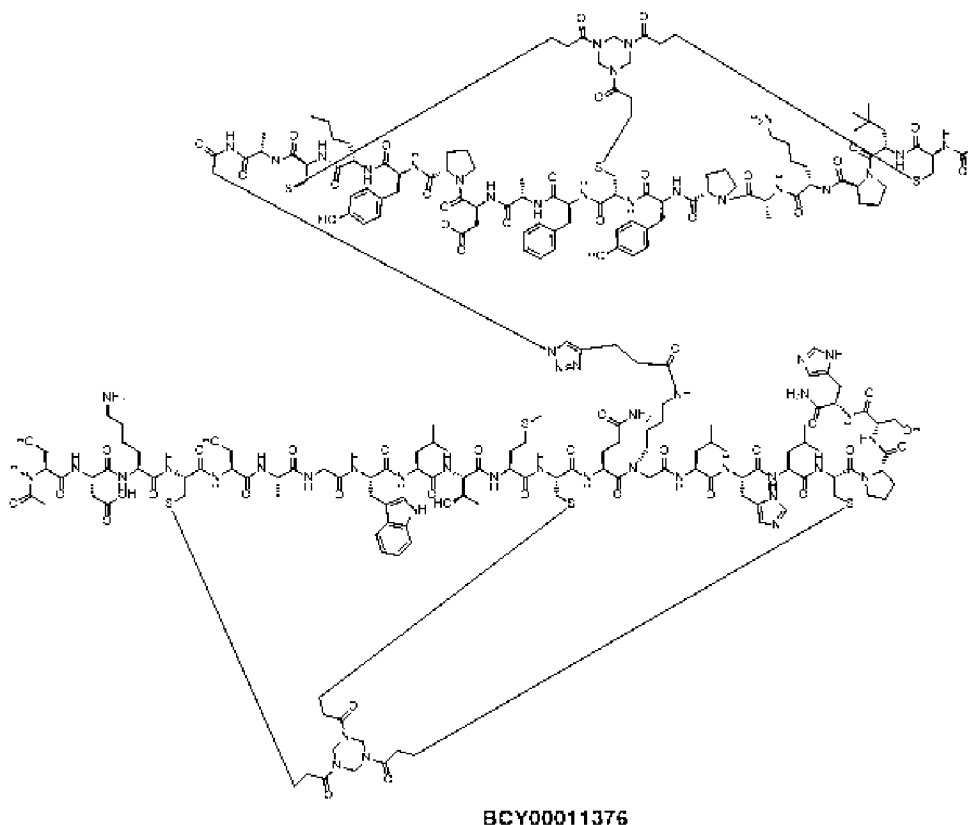
Методика получения ВСУ11019



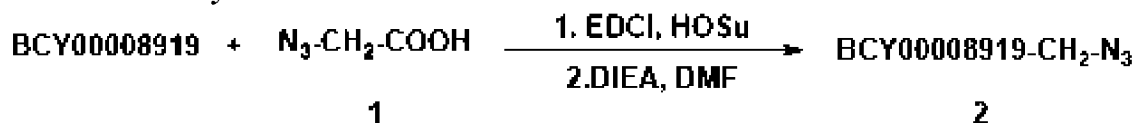
2

Соединение 2 (которое может быть получено, как описано в методике получения ВСУ10581; 8,0 мг, 2,94 мкмоль, 1,0 экв.) и ВСУ10861 (8,0 мг, 2,95 мкмоль, 1,0 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 14,7 мкл, 2,0 экв.), VcNa (1,2 мг, 6,05 мкмоль, 2,0 экв.) и THPTA (1,3 мг, 2,99 мкмоль, 1,0 экв.). Наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 35°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 5437,26, наблюдаемое m/z: 1088,09 ([M/5+H]⁺) и 1360,19 ([M/4+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали ВСУ11019 (7,6 мг, 1,36 мкмоль, выход 46,09%, чистота 96,95%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ11376

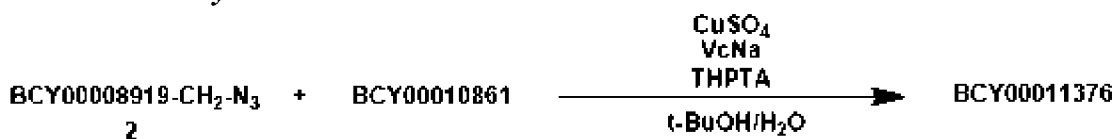


Методика получения соединения 2



К раствору соединения 1 (5,0 г, 49,5 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли EDCI (8,5 мг, 54,8 мкмоль, 1,1 экв.) и HOSu (5,7 мг, 49,5 мкмоль, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 30 минут. ТСХ показала, что соединение 1 было полностью израсходовано, и образовалось одно новое пятно. Затем к 0,2 мл этой смеси добавляли BCY8919 (20,0 мг, 9,62 мкмоль) и DIEA (1,7 мкл, 9,62 мкмоль). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BCY8919 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2162,51, наблюдаемое m/z : 1081,8 ($[M/2+H]^+$)). Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя и получали остаток с последующей очисткой с помощью препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (12 мг, 5,55 мкмоль, выход 56,28%, чистота 97,54%) получали в виде белого твердого вещества.

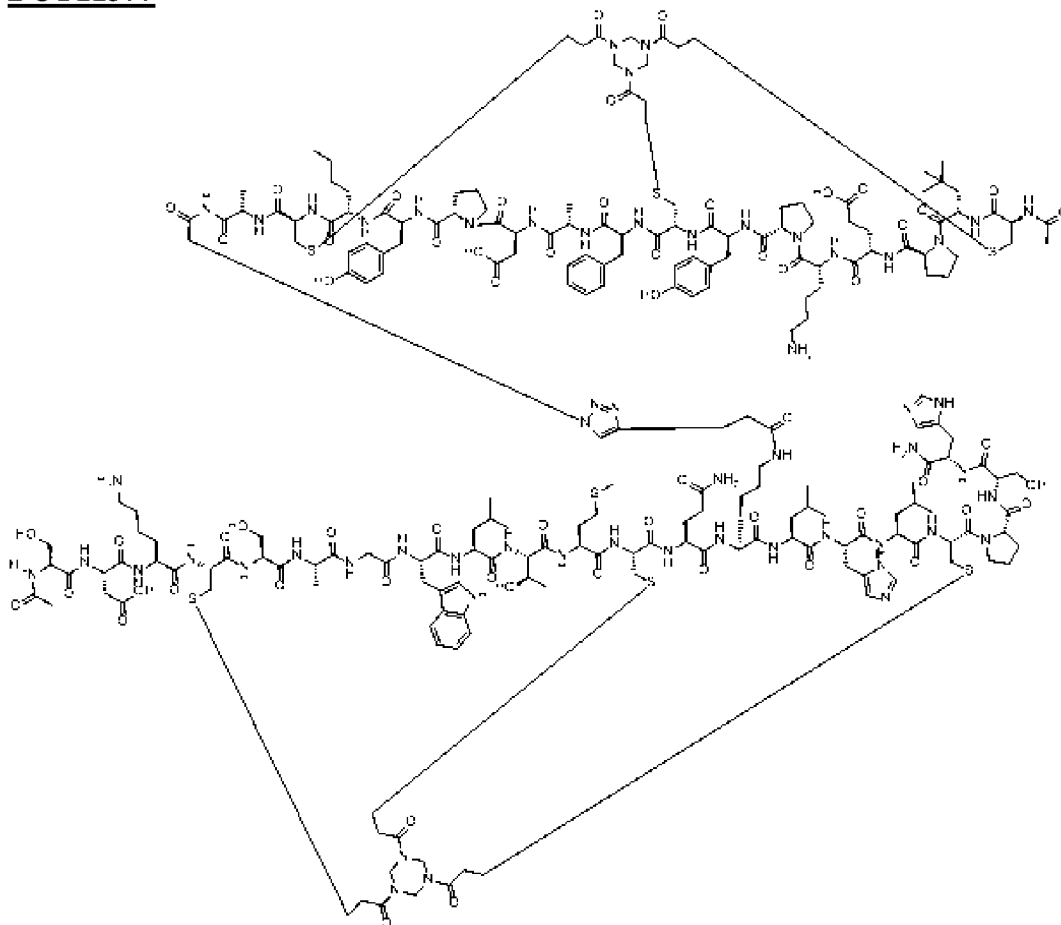
Методика получения BCY11376



Смесь соединения 2 (3 мг, 1,39 мкмоль, 1,0 экв.), BCY10861 (3,8 мг, 1,40 мкмоль, 1,0 экв.) и THPTA (1,2 мг, 2,76 мкмоль, 2,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл,

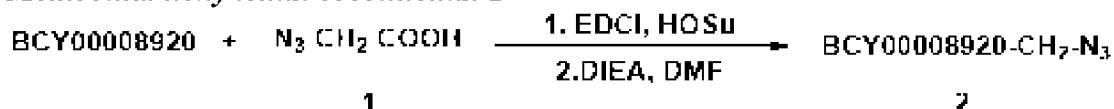
предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 3,5 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 3,5 мкл, 1,0 экв.) под N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что BCY10861 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 4878,64, наблюдаемое m/z: 1220,8 ([M/4+H]⁺)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали BCY11376 (1,9 мг, 1,0 мкмоль, выход 27,01%, чистота 96,2%) в виде белого твердого вещества.

BCY11377



BCY00011377

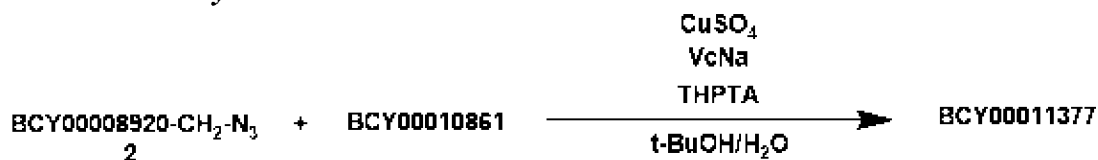
Методика получения соединения 2



К раствору соединения 1 (5,0 г, 49,5 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли EDCI (8,5 мг, 54,8 мкмоль, 1,1 экв.) и HOSu (5,7 мг, 49,5 мкмоль, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 30 минут. ТСХ показала, что соединение 1 было полностью израсходовано, и образовалось одно новое пятно. Затем к 0,2 мл этой смеси

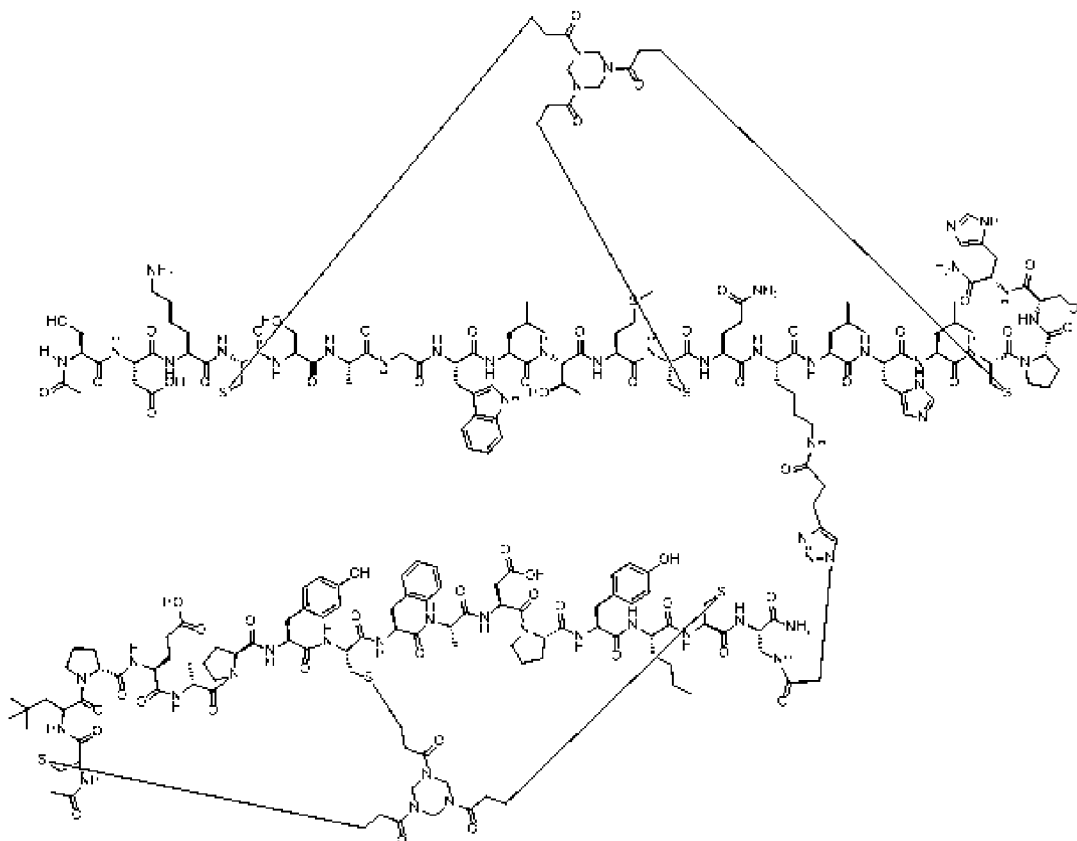
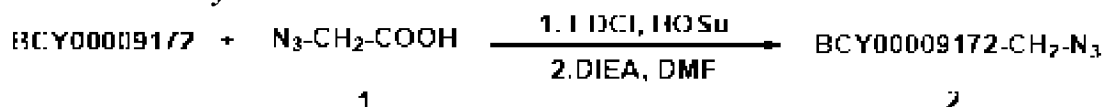
добавляли ВСУ8920 (20,0 мг, 9,36 мкмоль) и DIEA (1,2 мг, 9,36 мкмоль). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что ВСУ8920 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2220,54, наблюдаемое m/z : 1110,90 ($[M/2+H]^+$)). Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя и получали остаток с последующей очисткой с помощью препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (12 мг, 5,15 мкмоль, выход 56,28%, чистота 95,3%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ11377

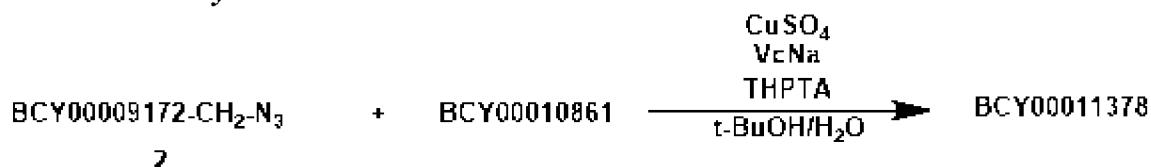


Смесь соединения 2 (3 мг, 1,35 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ10861 (3,8 мг, 1,35 мкмоль, 1,0 экв.) и THPTA (0,6 мг, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 3,4 мкл, 1 экв.) и VcNa (0,4 М, 3,4 мл, 1 экв.) под N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 4936,68, наблюдаемое m/z : 1234,9 ($[M/4+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали ВСУ11377 (3,5 мг, 0,66 мкмоль, выход 48,86%, чистота 93,1%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ11378

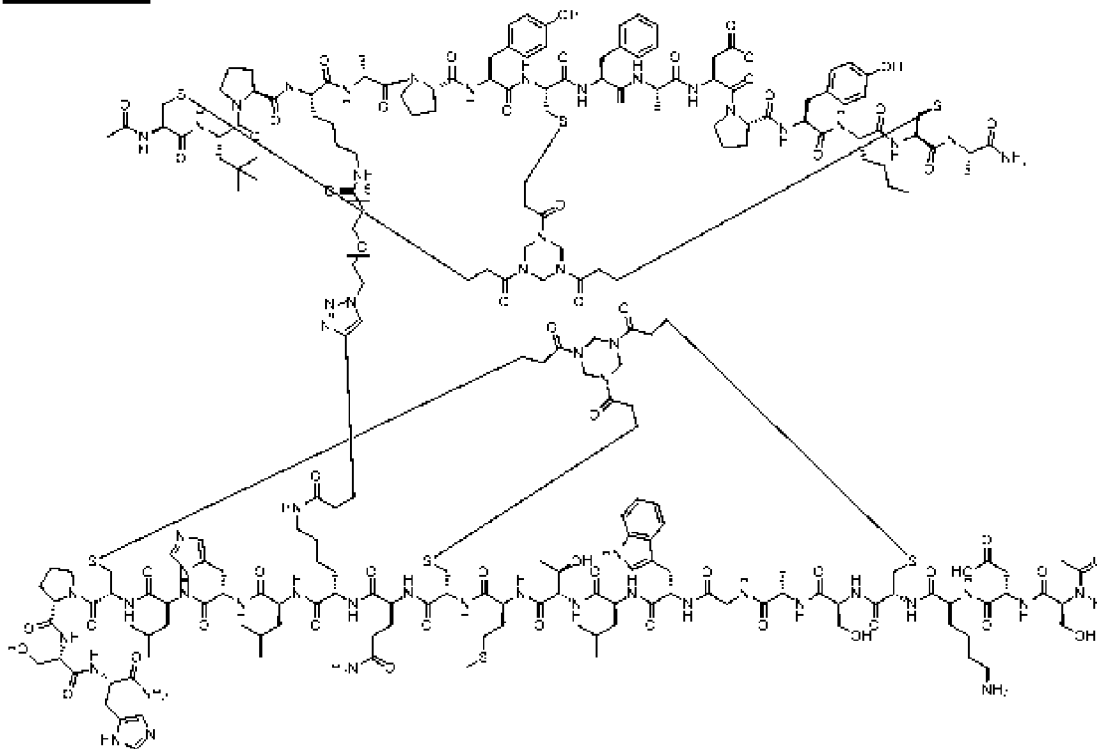
**BCY00011378****Методика получения соединения 2**

К раствору соединения 1 (5,0 г, 49,5 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли EDCI (8,5 мг, 54,8 мкмоль, 1,1 экв.) и HOSu (5,7 мг, 49,5 мкмоль, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 30 минут. ТСХ показала, что соединение 1 было полностью израсходовано и образовалось одно новое пятно. Затем 0,2 мл этой смеси добавляли к BCY9172 (20,0 мг, 9,54 мкмоль) и DIEA (1,7 мкл, 9,62 мкмоль). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2176,49, наблюдаемое m/z: 1090,0 ([M/2+H]⁺)). Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя и получали остаток с последующей очисткой с помощью препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA). Соединение 2 (20,2 мг, 7,48 мкмоль, выход 78,34%, чистота 80,57%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY11378

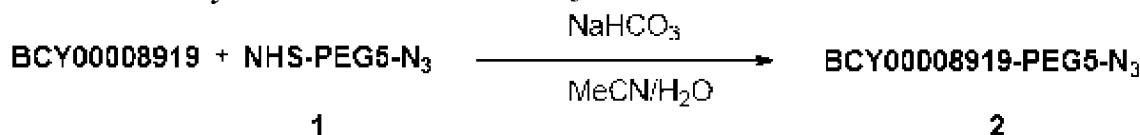
Смесь соединения 2 (5 мг, 2,30 мкмоль, 1,0 экв.), BCY10861 (6,24 мг, 2,30 мкмоль, 1,0 экв.) и ТНРТА (1,0 мг, 1,0 экв.) растворяли в *t*-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 5,8 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 5,8 мл, 1,0 экв.) под N₂. pH этого раствора довели до 8, добавляя по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в соотношении 1:1 с *t*-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с желаемым *m/z* (расчетный MW: 4894,61, наблюдаемое *m/z*: 1224,3 ([M/4+H]⁺). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали BCY11378 (1,2 мг, 0,34 мкмоль, выход 10,07%, чистота 94,3%) в виде белого твердого вещества.

BCY11379



BCY00011379

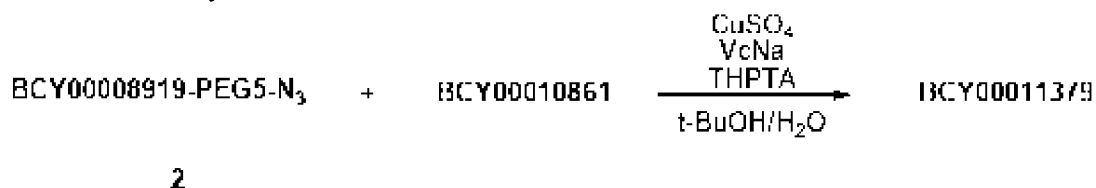
Методика получения BCY8919-PEG5-N₃



BCY8919 (30,0 мг, 14,43 мкмоль, 1,0 экв.) и соединение 1 (6,3 мг, 14,57 мкмоль, 1,01 экв.) растворяли в смеси MeCN (1 мл) и H₂O (1 мл). К раствору добавляли 1 М NaHCO₃ для доведения pH до 8, а затем смесь перемешивали при 35°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BCY8919 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым *m/z* (расчетный MW: 2396,79, наблюдаемое *m/z*: 1198,74 ([M/2+H]⁺) и

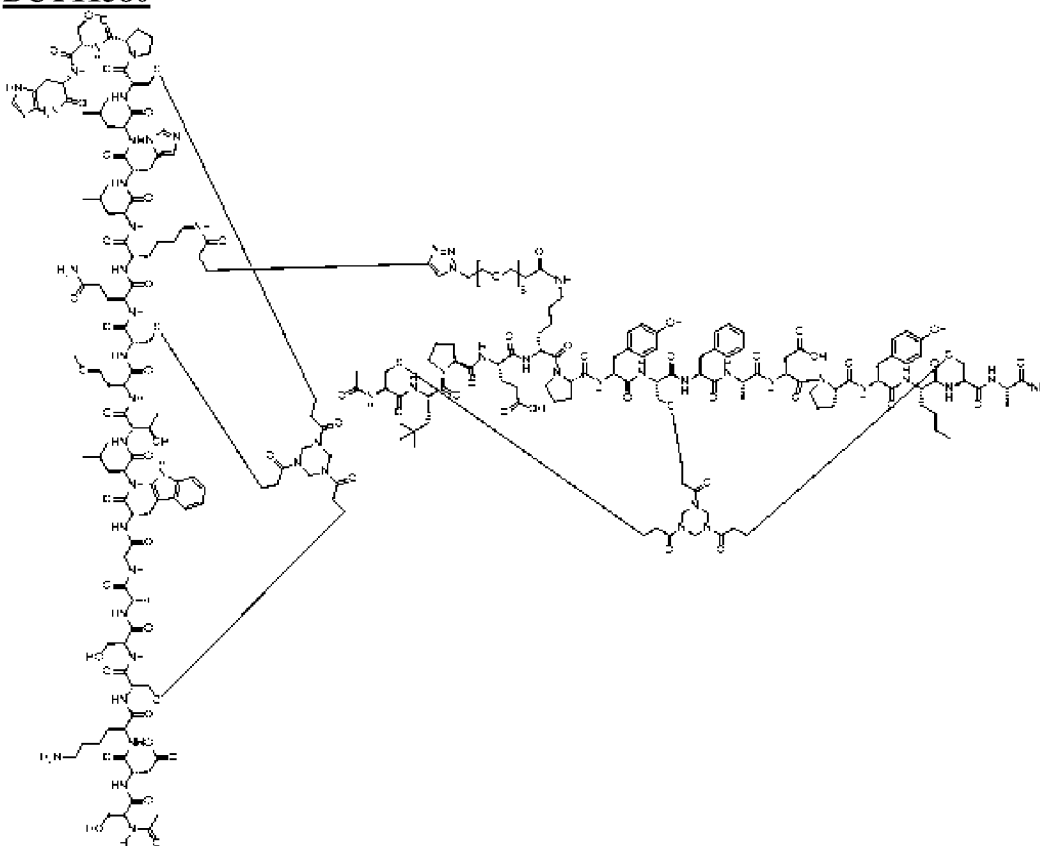
799,50 ($[M/4+H]^+$). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали соединение 2 (20 мг, 8,07 мкмоль, выход 55,92%, чистота 96,68%) в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ11379



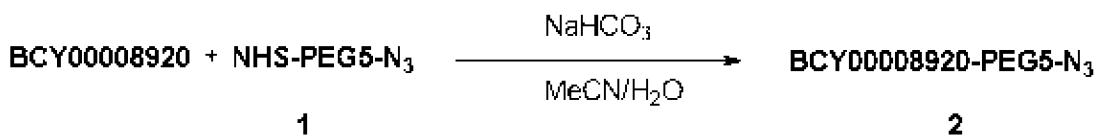
Соединение 2 (3,0 мг, 1,25 мкмоль, 1,0 экв.) и ВСУ10861 (3,4 мг, 1,25 мкмоль, 1,0 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 7 мкл, 2,24 экв.), VcNa (1 мг, 5,04 мкмоль, 4,03 экв.) и THPTA (1 мг, 2,30 мкмоль, 1,84 экв.). Наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 5112,93, наблюдаемое m/z: 1022,96 ($[M/5+H]^+$) и 1278,74 ($[M/4+H]^+$)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали ВСУ11379 (3,4 мг, 0,615 мкмоль, выход 52,00%, чистота 97,88%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ11380



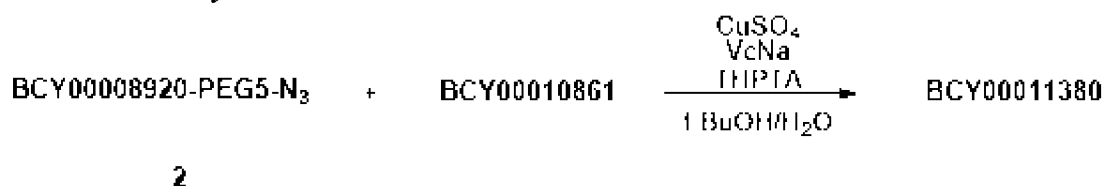
ВСУ00011380
Молекулярный вес: 4994,77

Методика получения ВСУ8920-PEG5-N₃



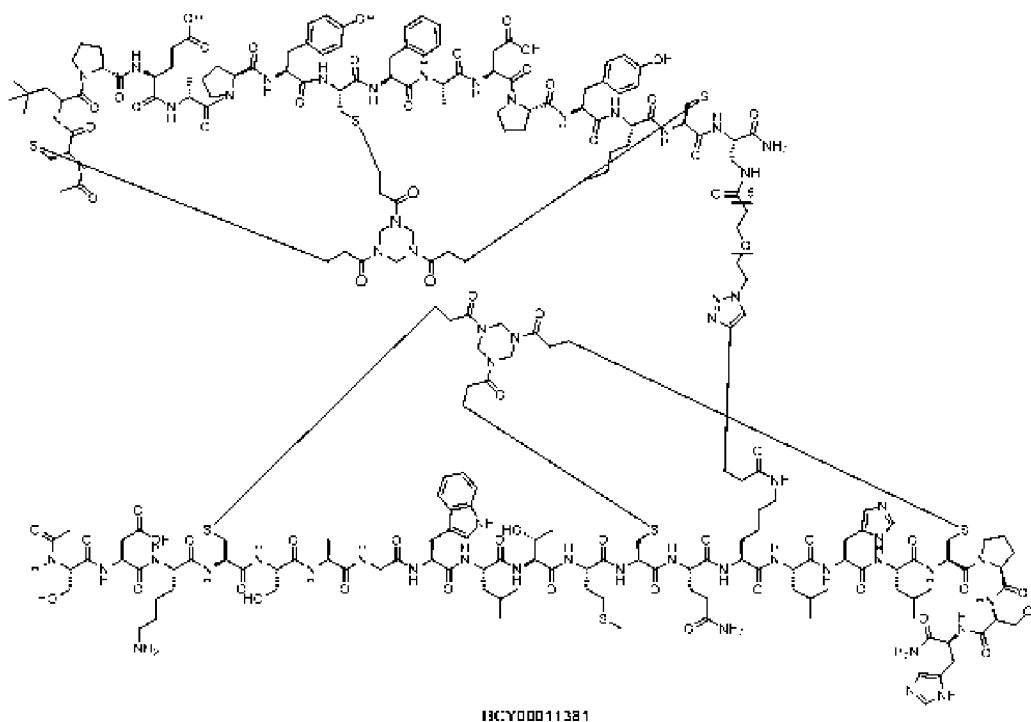
BCY8920 (30,0 мг, 14,04 мкмоль, 1,0 экв.) и соединение 1 (6,1 мг, 14,11 мкмоль, 1,01 экв.) растворяли в смеси MeCN (1 мл) и H₂O (1 мл). К раствору добавляли 1 М NaHCO₃, чтобы довести pH до 8, а затем смесь перемешивали при 35°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BCY8920 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2454,83, наблюдаемое m/z: 1227,63 ([M/2+H]⁺) и 818,66 ([M/3+H]⁺). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), и соединение 2 (20 мг, 8,03 мкмоль, выход 57,21%, чистота 98,56%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY11380

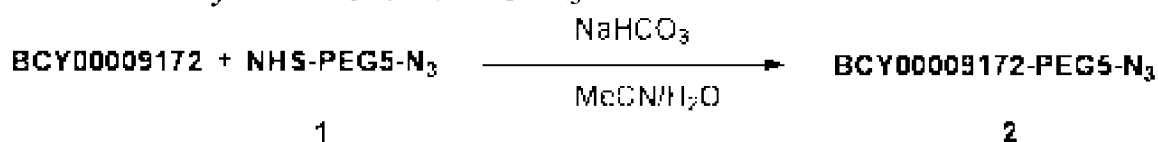


Соединение 2 (3,5 мг, 1,43 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY10861 (3,9 мг, 1,44 мкмоль, 1,0 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 8 мкл, 2,24 экв.), VcNa (1 мг, 5,04 мкмоль, 3,52 экв.) и THPTA (1 мг, 2,30 мкмоль, 1,61 экв.). Наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал, что большая часть соединения 2 была израсходована, и один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 5170,97, наблюдаемое m/z: 1034,28 ([M/5+H]⁺) и 1293,10 ([M/4+H]⁺). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали BCY11380 (1,6 мг, 0,296 мкмоль, выход 20,77%, чистота 96,77%) в виде белого твердого вещества.

BCY11381

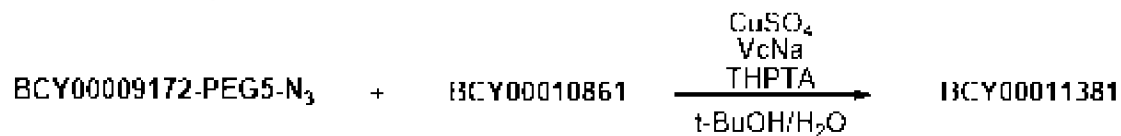


Методика получения BCY8920-PEG5-N₃



BCY9172 (30,0 мг, 14,32 мкмоль, 1,0 экв.) и соединение 1 (6,2 мг, 14,34 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в смеси MeCN (1 мл) и H₂O (1 мл). К раствору добавляли 1 М NaHCO₃, чтобы довести pH до 8, а затем смесь перемешивали при 35°C в течение 2 часов. ЖХ-МС анализ показал, что BCY9172 было израсходовано полностью, и был обнаружен один основной пик с желаемым m/z (расчетный MW: 2412,75, наблюдаемое m/z: 1206,72 ([M/2+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA), и соединение 2 (15 мг, 6,14 мкмоль, выход 42,87%, чистота 98,75%) получали в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY11381



Соединение 2 (3,0 мг, 1,24 мкмоль, 1,0 экв.) и BCY10861 (3,4 мг, 1,25 мкмоль, 1,01 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 7 мкл, 2,25 экв.), VcNa (1 мг, 5,04 мкмоль, 4,06 экв.) и THPTA (1 мг, 2,30 мкмоль, 1,85 экв.). Наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃, чтобы довести pH до 8. Все растворители в настоящей методике дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. ЖХ-МС анализ показал один пик с желаемым m/z

(расчетный MW: 5128,89, наблюдаемое m/z: 1026,05 ($[M/5+H]^+$) и 1282,50 ($[M/4+H]^+$)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (в присутствии TFA) и получали BCY11381 (1,6 мг, 0,295 мкмоль, выход 23,73%, чистота 94,59%) в виде белого твердого вещества.

Пример 5: продукция моноклонального антитела-агониста CD137

Последовательность моноклонального антитела-агониста CD137, которую использовали для сравнения с мультимерами CD137 в представленных в настоящем документе экспериментах, раскрыта в патенте США № 7288638. Антитело с изотипом IgG4 экспрессировали с использованием системы экспрессии ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific) после транзientной трансфекции конструкцией для экспрессии ДНК. Антитело очищали аффинной хроматографией на белке А и получали в фосфатно-буферном растворе (PBS), pH 7,2. Анализ чистоты с использованием гель-фильтрационной ВЭЖХ (колонка GF-250, Agilent) показал, что количество мономеров моноклонального антитела CD137 составляет примерно 95%. Анализ активности связывания показал, что анти-CD137 моноклональное антитело с концентрацией выше 1 мкг/мл может связываться с клетками CHO, экспрессирующими CD137. Анализ на эндотоксины с использованием набора для анализа на эндотоксины, ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (Genscript), показал, что препарат анти-CD137 моноклонального антитела содержал <7 эндотоксисных единиц/мг эндотоксина.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

1. Описание эксперимента по связыванию с CD137 на Biacore

Эксперименты на установке Biacore проводили для определения значений k_a ($M^{-1}s^{-1}$), k_d (s^{-1}), K_D (нМ) для гетеротандемных пептидов, связывающихся с белком CD137 человека. Рекомбинантный CD137 человека (R&D systems) ресуспендировали в PBS и биотинилировали с использованием реагента EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Fisher) в соответствии с протоколом, предложенным производителем. Белок обессоливали для удаления несвязанного биотина с помощью спин-колонок в PBS.

Для анализа связывания пептидов использовали прибор Biacore T200 или Biacore 3000 с чипом ХанТес CMD500D. Стрептавидин иммобилизовали на чипе с использованием стандартных реакций присоединения по аминам при 25°C с HBS-N (10 mM HEPES, 0,15 M NaCl, pH 7,4) в качестве рабочего буфера. Кратко, карбоксиметилдекстрановую поверхность активировали путем 7-минутного впрыскивания 0,4 M гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и 0,1 M N-гидроксисукцинимид (NHS) в соотношении 1:1 при расходе 10 мкл/мин. Для захвата стрептавидаина белок разводили до 0,2 мг/мл в 10 mM ацетате натрия (pH 4,5) и захватывали путем впрыскивания 120 мкл на активированную поверхность чипа. Остаточные активированные группы блокировали 7-минутным впрыскиванием 1 M этаноламина (pH 8,5), и биотинилированный CD137 захватывали до уровня 270-1500 RU. Заменяли буфер был на PBS/0,05% Tween 20, и в этом же буфере приготавливали серию разведений пептидов с конечной концентрацией DMSO 0,5%. Максимальная

концентрация пептида составляла 500 нМ с 6 дополнительными 2-кратными или 3-кратными разведениями. SPR-анализ проводили при 25°C при скорости потока 90 мкл/мин с 60 секундами на связывание и 900 секундами на диссоциацию. После каждого цикла проводили стадию регенерации (1 мл 10 мМ глицина, рН 2). При необходимости данные были скорректированы с учетом объемных эффектов с исключением DMSO. Все данные дважды корректировали на холостые впрыскивания и эталонную поверхность с использованием стандартных процедур обработки, а обработку данных и кинетическую подгонку выполняли с использованием программного обеспечения Scrubber, версия 2.0с (программное обеспечение BioLogic). Данные аппроксимировали с использованием простой модели связывания 1:1 с учетом эффектов массопереноса при необходимости.

Некоторые гетеротандемные пептиды были протестированы в этом анализе, и результаты показаны в таблице 1 ниже:

Таблица 1: данные анализа на связывание CD137 гетеротандемными пептидами на установке Biacore

Идентификационный номер (ID) комплекса	SPR (K_D)(нМ)
BCY9173	7,98
BCY7985	143
BCY8942	853
BCY8943	156
BCY9647	206
BCY9648	202
BCY9655	199
BCY9656	159
BCY9657	256
BCY9658	152
BCY9659	88,1
BCY9758	189
BCY8854	108
BCY9350	69,4
BCY9351	3640
BCY9399	73
BCY9400	53
BCY9408	105
BCY9409	97,7
BCY9410	65,8
BCY9411	71,1

BCY9759	44,3
BCY10000	6,19
BCY10571	12,03
BCY10572	5,00
BCY10573	3,39

2. Описание эксперимента по связыванию с нектином-4 на Biacore

Эксперименты Biacore проводили для определения значений k_a ($M^{-1}s^{-1}$), k_d (s^{-1}), K_D (нМ) для гетеротандемных пептидов, связывающихся с белком нектин-4 человека (полученным от Charles River). Нектин-4 человека (остатки Gly32-Ser349; NCBI RefSeq: NP_112178.2) с сигнальной последовательностью gp67 и С-концевой меткой FLAG клонировали в pFastbac-1, и получали в бакуловирусах с использованием стандартных протоколов Bac-to-Bac™ (Life Technologies). Клетки Sf21 в количестве 1×10^6 /мл в среде Excell-420 (Sigma) при 27°C инфицировали при MOI, равной 2, используя вирусный концентрат P1, и супернатант собирали через 72 часа. Супернатант связывали в объеме в течение 1 часа при 4°C на аффинной агарозной смоле Anti-FLAG M2 (Sigma), промытой PBS, а затем смолу переносили в колонку и тщательно промывали PBS. Белок элюировали 100 мкг/мл пептида FLAG. Элюированный белок концентрировали до 2 мл и наносили в колонку S-200 Superdex (GE Healthcare) в PBS со скоростью 1 мл/мин. Собирали фракции по 2 мл, и фракции, содержащие нектин-4, концентрировали до 16 мг/мл.

Белок биотинилировали случайным образом в PBS с использованием реагента EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Fisher) в соответствии с протоколом, предложенным производителем. Белок обессоливали для удаления несвязанного биотина с помощью спин-колонок в PBS.

Для анализа связывания пептидов использовали прибор Biacore 3000 с чипом CM5 chip (GE Healthcare). Стрептавидин иммобилизовали на чипе с использованием стандартных реакций присоединения по аминам при 25°C с HBS-N (10 mM HEPES, 0,15 M NaCl, pH 7,4) в качестве рабочего буфера. Кратко, карбоксиметилдекстрановую поверхность активировали путем 7-минутного впрыскивания 0,4 M гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и 0,1 M N-гидроксисукцинимид (NHS) в соотношении 1:1 при расходе 10 мкл/мин. Для захвата стрептавидина белок разводили до 0,2 мг/мл в 10 mM ацетате натрия (pH 4,5) и захватывали путем впрыскивания 120 мкл стрептавидина на активированную поверхность чипа. Остаточные активированные группы блокировали 7-минутным впрыскиванием 1 M этаноламина (pH 8,5), и биотинилированный нектин-4 захватывали до уровня 1200-1800 RU. Заменяли буфер был на PBS/0,05% Tween 20, и в этом же буфере приготавливали серию разведений пептидов с конечной концентрацией DMSO 0,5%. Максимальная концентрация пептида составляла 100 нМ с 6 дополнительными 2-кратными разведениями. SPR-анализ проводили при 25°C при скорости потока 50 мкл/мин с 60 секундами на связывание и 400-1200 секундами на диссоциацию в зависимости от отдельного пептида. Все данные дважды корректировали

на холостые впрыскивания и эталонную поверхность с использованием стандартных процедур обработки, а обработку данных и кинетическую подгонку выполняли с использованием программного обеспечения Scrubber, версия 2.0с (программное обеспечение BioLogic). Данные аппроксимировали с использованием простой модели связывания 1:1 с учетом эффектов массопереноса при необходимости.

Некоторые гетеротандемные пептиды были протестированы в описанном выше анализе на связывание нектин-4, и результаты показаны в таблице 2 ниже:

Таблица 2: данные анализа на связывание нектин-4 гетеротандемными пептидами на установке Biacore

Идентификационный номер (ID) комплекса	SPR (K_D)(нМ)
BCY8854	2,76
BCY9350	> 200 нМ
BCY9351	2,47
BCY9399	1,67
BCY9400	1,8
BCY9408	1,57
BCY9409	1,66
BCY9410	1,49
BCY9411	1,48
BCY9759	2,14
BCY10000	2,26

3. Описание эксперимента по связыванию с EphA2 на Biacore

Эксперименты Biacore проводили для определения значений k_a ($M^{-1}s^{-1}$), k_d (s^{-1}), K_D (нМ) для гетеротандемных пептидов, связывающихся с белком EphA2 человека.

EphA2 биотинилировали с помощью EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin в течение 1 часа в 4 мМ ацетате натрия, 100 мМ NaCl, pH 5,4 с 3-кратным молярным избытком биотина над белком. Степень мечения определяли с использованием набора для количественного определения флуоресценции биотина (Thermo) после диализа реакционной смеси в PBS. Для анализа связывания пептидов использовали прибор Biacore T200 с чипом ХанТес CMD500D. Стрептавидин иммобилизовали на чипе с использованием стандартных реакций присоединения по аминам при 25°C с HBS-N (10 мМ HEPES, 0,15 М NaCl, pH 7,4) в качестве рабочего буфера. Кратко, карбоксиметилдекстрановую поверхность активировали путем 7-минутного впрыскивания 0,4 М гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и 0,1 М N-гидроксисукцинимид (NHS) в соотношении 1:1 при расходе 10 мкл/мин. Для захвата стрептавидаина белок разводили до 0,2 мг/мл в 10 мМ ацетате натрия (pH 4,5) и захватывали путем впрыскивания 120 мкл стрептавидаина на активированную поверхность чипа. Остаточные активированные группы блокировали 7-минутной инъекцией 1 М

этанолamina (pH 8,5):HBS-N (1:1). Буфер заменяли на PBS/0,05% Tween 20, и биотинилированный EphA2 захватывали до уровня 500-1500 RU с использованием белка, разведенного до 0,2 мМ в буфере. В этом буфере готовили серию разведений пептидов с конечной концентрацией DMSO 0,5% с максимальной концентрацией пептида 50 или 100 нМ и еще 6 2-кратных разведений. SPR-анализ проводили при 25°C при скорости потока 90 мкл/мин с 60 секундами на связывание и 900-1200 секундами на диссоциацию. Данные были скорректированы с учетом объемных эффектов, исключенных DMSO. Все данные дважды корректировали на холостые впрыскивания и эталонную поверхность с использованием стандартных процедур обработки, а обработку данных и кинетическую подгонку выполняли с использованием программного обеспечения Scrubber, версия 2.0с (программное обеспечение BioLogic). Данные аппроксимировали с использованием простой модели связывания 1:1 с учетом эффектов массопереноса при необходимости.

Некоторые гетеротандемные пептиды были протестированы в описанном выше анализе на связывание EphA2, и результаты показаны в таблице 3 ниже:

Таблица 3: данные анализа на связывание EphA2 гетеротандемными пептидами на установке Biacore

Идентификационный номер (ID) комплекса	SPR (K _D)(нМ)
BCY9173	2,1
BCY7985	2
BCY8942	1,7
BCY8943	> 200 нМ
BCY9647	1,69
BCY9648	1,75
BCY9655	1,33
BCY9656	0,75
BCY9657	1,1
BCY9658	1,9
BCY9659	1,03
BCY9758	1,5

4. Репортерный анализ на CD137 при совместном культивировании с опухолевыми клетками

Культуральную среду, называемую средой R1, готовят путем добавления 1% FBS к RPMI-1640 (компоненту набора Promega CS196005). Серийные разведения исследуемых препаратов в R1 готовят в стерильном 96-луночном планшете. Используют 25 мкл на лунку тестируемых препаратов или R1 (в качестве фонового контроля) для указанных лунок в белом клеточном культуральном планшете. Опухолевые клетки* собирают и ресуспендируют при концентрации 400000 клеток/мл в среде R1. Двадцать пять (25) мкл/лунку опухолевых клеток используют в белом клеточном культуральном планшете.

Клетки Jurkat (набор Promega CS196005, 0,5 мл) размораживают на водяной бане и затем добавляют в 5 мл предварительно нагретой среды R1. Двадцать пять (25) мкл/лунку клеток Jurkat используют в белом клеточном культуральном планшете. Клетки инкубируют с тестируемыми образцами в течение 6 часов при 37°C, 5% CO₂. Через 6 часов добавляют по 75 мкл/лунку Bio-Glo™ (Promega) и инкубируют 10 минут перед считыванием люминесценции в планшетном ридере (Clariostar, BMG). Рассчитывают кратность изменения относительно клеток (клетки Jurkat+клеточная линия, используемая в совместном культивировании) и строят график в GraphPad Prism зависимости ответа от логарифма концентрации агониста для определения EC50 (нМ) и кратности индукции относительно фона (максимальной)

Тип опухолевых клеток, используемых в совместном культивировании, зависит от опухолевой мишени, специфичной для гетеротандема, как показано в таблице 4 ниже:

Таблица 4: клеточные линии, используемые для каждой опухолевой мишени

Опухолевая мишень	Клеточные линии, используемые для совместного культивирования
EphA2	A549, SC-OV-3, PC3, LNCaP
Нектин-4	HT1376, NCI-H292
PD-L1	RKO

Данные представлены на фигуре 3, которая показывает, что гетеротандем EphA2-CD137, BSY7985, показал сильную индукцию CD137-активности клеток в люциферазном репортерном анализе на CD137 от Promega в присутствии экспрессирующих EphA2 клеток HT1080. Индукция CD137 гетеротандемом отсутствует без клеток HT1080.

Данные представлены на фигуре 4, которая показывает, что гетеротандемы EphA2/CD137 индуцируют сильную активацию CD137 в репортерном анализе на CD137, и кратность индукции активации зависит от уровня экспрессии опухолевой мишени в клеточной линии (A549 и SC-OV-3: высокий уровень экспрессии EphA2 (высок. EphA2), и LNCaP: низкий уровень экспрессии EphA2 (низк. EphA2)), используемой в совместном культивировании.

Данные представлены на фигуре 6, которая показывает, что гетеротандемы нектин-4/CD137 индуцируют сильную активацию CD137 репортерном анализе на CD137, и кратность индукции активации зависит от уровня экспрессии опухолевой мишени в клеточной линии (HT1376: высокий уровень экспрессии нектин-4 (высок. нектин-4), и NCI-H292: средний уровень экспрессии нектин-4 (средн. нектин-4), используемой в совместном культивировании.

Данные представлены на фиг. 9, которая показывает, что гетеротандемы PD-L1/CD137 индуцируют сильную активацию CD137 в репортерном анализе на CD137 в присутствии линии клеток, экспрессирующей PD-L1. Сводные данные по EC50 (нМ) и кратности индукции, вызываемой гетеротандемными пептидами, в репортерном анализе на CD137 при совместном культивировании с различными клеточными линиями,

представлены в таблице 5 ниже:

Таблица 5: кратность индукции, вызываемой гетеротандемными пептидами в репортерном анализе на CD137

ID комплекса	Опухолевая мишень	Клеточная линия, используемая в совместном культивировании	EC50 (нМ)	Кратность индукции относительно фона
BCY9173	EphA2	SC-OV-3	0,94	21
BCY7985	EphA2	SC-OV-3	4,0	15
BCY8942	EphA2	PC3	-	< 2-кратной индукции при 100 нМ
BCY8943	EphA2	PC3	-	< 2-кратной индукции при 100 нМ
BCY9647	EphA2	SC-OV-3	7,2	24
BCY9648	EphA2	SC-OV-3	9,3	20
BCY9655	EphA2	SC-OV-3	4,1	6
BCY9656	EphA2	SC-OV-3	1,1	3
BCY9657	EphA2	SC-OV-3	9,0	26
BCY9658	EphA2	SC-OV-3	6,2	11
BCY9659	EphA2	SC-OV-3	9,9	7
BCY9758	EphA2	SC-OV-3	1,2	7
BCY10568	EphA2	PC3	0,25	32
BCY10570	EphA2	PC3	0,41	38
BCY10574	EphA2	PC3	1,0	32
BCY10575	EphA2	PC3	0,62	38
BCY10576	EphA2	PC3	0,51	38
BCY10577	EphA2	PC3	0,28	37
BCY8854	Нектин-4	H1376	1,2	30
BCY9350	Нектин-4	H1376	-	< 2-кратной индукции при 100 нМ
BCY9351	Нектин-4	H1376	-	< 2-кратной индукции при 100 нМ
BCY9399	Нектин-4	H1376	11	13
BCY9400	Нектин-4	H1376	2,9	13

BCY9401	Нектин-4	H1376	18	70
BCY9407	Нектин-4	H1376	3,4	29
BCY9408	Нектин-4	H1376	1,1	20
BCY9409	Нектин-4	H1376	1,2	24
BCY9410	Нектин-4	H1376	1,3	24
BCY9411	Нектин-4	H1376	14	41
BCY9759	Нектин-4	H1376	2,7	15
BCY10000	Нектин-4	H1376	0,58	61
BCY10567	Нектин-4	H1376	1,7	45
BCY10569	Нектин-4	H1376	1,2	52
BCY10571	Нектин-4	H1376	3,5	60
BCY10572	Нектин-4	H1376	0,44	55
BCY10573	Нектин-4	H1376	0,90	55
BCY10578	Нектин-4	H1376	0,42	58
BCY10917	Нектин-4	H1376	0,27	54
BCY11020	Нектин-4	H1376	0,26	47
BCY11373	Нектин-4	H1376	0,16	74
BCY11374	Нектин-4	H1376	0,091	72
BCY11375	Нектин-4	H1376	0,23	72
BCY8939	Мышиный PD-L1	MC38	-	< 2-кратной индукции при 100 нМ
BCY10580	PD-L1	RKO	28	3
BCY10581	PD-L1	RKO	18	6
BCY10582	PD-L1	RKO	28	4
BCY11017	PD-L1	RKO	66	4
BCY11018	PD-L1	RKO	27	7
BCY11019	PD-L1	RKO	18	6
BCY11376	PD-L1	RKO	127	9
BCY11377	PD-L1	RKO	40	6
BCY11378	PD-L1	RKO	80	3
BCY11379	PD-L1	RKO	68	6
BCY11380	PD-L1	RKO	34	7
BCY11381	PD-L1	RKO	105	7

5. Совместное культивирование первичных Т-клеток человека и A549

(уничтожение опухолевых клеток)

РВМС выделяли из образцов крови от трех здоровых доноров и добавляли к меченым Nuclight Red опухолевым клеткам-мишеням (клеткам карциномы легкого человека, A549®, ATCC CLL-185™) в двух определенных соотношениях при двух концентрациях анти-CD3 стимуляции. Совместные культуры опухолевых клеток и РВМС инкубировали с перспективными бициклами при трех концентрациях. Все экспериментальные условия также проверяли на опухолевых клетках в отсутствие стимулированных РВМС для выявления прямой цитотоксичности в отношении опухолевых клеток. Уничтожение опухолей оценивали путем подсчета жизнеспособных Nuclight red-положительных опухолевых клеток через определенное время. Кроме того, использовали окрашивание на каспазы-3/7 для идентификации апоптотических опухолевых клеток. Культуры анализировали с использованием прибора IncuCyte S3, который позволяет получать флуоресцентные изображения живых клеток в реальном времени. Совместные культуры визуализировали в течение 72 часов. Каждое экспериментальное условие выполняли в трипликатах.

Данные представлены на фиг. 5, которая демонстрирует, что гетеротандемы EphA2/CD137 индуцируют гибель опухолевых клеток в анализе совместного культивирования первичных Т-клеток человека и раковых клеток. Анти-CD137 агонистическое mAb использовали в качестве контроля.

6. Анализ совместного культивирования РВМС человека и 4Т1 (высвобождение цитокинов)

Линию опухолевых клеток молочной железы мыши 4Т1-1 (4Т1-родительская) и 4Т1 со сверхэкспрессией мышинового нектин-4 (4Т1-D02) культивировали в RPMI1640 с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки, 100 МЕ/мл пенициллина и 100 МЕ/мл стрептомицина, 20 мМ HEPES, 1X незаменимых аминокислот и 2 мМ L-глутамина (рабочая среда RPMI). Замороженные РВМС от здоровых доноров (человека) размораживали и промывали один раз в PBS при комнатной температуре, а затем ресуспендировали в рабочей среде RPMI. Для совместного культивирования опухолевых клеток и РВМС, 10000 РВМС и 2000 опухолевых клеток (5:1) смешивали и высевали в каждую лунку 384-луночного планшета. Для стимуляции РВМС человека в культуру добавляли 125 нг/мл растворимого mAb против CD3 (клон ОКТ3) в нулевой день. Тестируемые соединения, контрольные соединения или контрольные носители добавляли в соответствующие лунки и доводили конечный объем на лунку до 100 мкл. Планшеты инкубировали в инкубаторе для культивирования клеток при 37°C с 5% CO₂ в течение до трех дней. Супернатанты собирали через 48 часов после стимуляции, и IL-2 и IFN γ человека определяли с помощью HTRF-анализа. Исходные данные анализировали с использованием программного обеспечения Excel или Prism для построения стандартных кривых для интерполяции концентраций белка. Данные представляют одно исследование с тремя различными донорскими РВМС, протестированными в дубликатах.

Данные, представленные на фиг. 7, демонстрируют, что нектин-4/CD137 гетеротандемы индуцируют устойчивую секрецию цитокинов IL-2 и IFN- γ в анализе совместного культивирования РВМС и 4Т1. ВСУ9350 и ВСУ9351 являются несвязывающими контролями для нектин-4 и CD137 соответственно.

Сводные данные по EC50 (нМ) и максимальной секреции цитокинов IFN- γ (пг/мл), индуцированной выбранными нектин-4/CD137 гетеротандемными пептидами в анализе совместного культивирования РВМС и 4Т1 человека (высвобождение цитокинов), представлены в таблице 6 ниже:

Таблица 6: EC50 и максимальная секреция цитокинов IFN- γ , индуцированная выбранными нектин-4/CD137 гетеротандемными пептидами в анализе совместного культивирования РВМС и 4Т1 человека (высвобождение цитокинов)

ИД комплекса	Клеточная линия	EC50 (нМ)	Максимальная концентрация IFN- γ (пг/мл)
ВСУ8854	4Т1-D02(нектин4+)	0,89	15962
ВСУ9350	4Т1-D02(нектин4+)	-	Нет активности до 1 мкМ
ВСУ9351	4Т1-D02(нектин4+)	-	Нет активности до 1 мкМ
ВСУ10000	4Т1-D02(нектин4+)	0,21	19642
ВСУ10571	4Т1-D02(нектин4+)	0,44	18349
ВСУ10572	4Т1-D02(нектин4+)	0,25	17915

7. Протокол культивирования ex vivo

Первичные опухолевые клетки, полученные от пациентов из Discovery Life Sciences (DLS), осторожно размораживают в 10 мл предварительно нагретой промывочной среды, содержащей свежую бензоназу. Набор 3D сфероидов от Greiner (номер по каталогу 655840) используется для содержания клеток в культуре в течение 2 дней. Кратко, количество опухолевых клеток подсчитывают с помощью трипанового синего с использованием гемоцитометра. Клетки центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 минут для промывания, и осадок ресуспендируют в 100 мкл N3D-наношатла на 1×10^6 клеток. Чтобы сделать их магнитными, клетки вращают со скоростью 1500 об/мин в течение 5 минут и ресуспендируют; этот процесс повторяют в целом 4 раза. После последнего вращения клетки ресуспендируют в соответствующем количестве свежей среды Lung DTC (DLS), чтобы получить 50000-100000 клеток на лунку в 10 мкл/лунку. Для этого эксперимента использовали 96-луночные клеточные планшеты с репеллентом от Greiner (кат.№ 655976). Если видны скопления клеток или мусор, то образец наносят на фильтр 70-100 мкм перед посевом. По меньшей мере 50000 клеток на образец резервируются для панели проточной цитометрии в нулевой день, эти клетки окрашивают, фиксируют и хранят при 4°C для последующего проточного анализа. Разведения контрольного/тестируемого соединения готовят в отдельном планшете в 2-кратной среде Lung DTC, и 100 мкл/лунку этих двукратных растворов соединений добавляют в лунки согласно схеме, расписанной для планшета. Затем аналитический

планшет помещают на 96-луночный магнитный сфероидальный привод в увлажненной камере при 37°C, 5% CO₂. Через 24 часа магнитный сфероидальный привод удаляют. Через 48 часов среду собирают для анализа цитокинов, и клетки собирают для панели проточной цитометрии на 2-й день. Содержание цитокинов количественно оценивают с использованием специально созданной панели цитокинов/хемокинов (IP-10, гранзим В, IFN γ , IL-2, IL-6, TNF α , IL-8, MIP-1a, MIP-1b, MCP-1, IL-10, MIG) от R&D systems на ридере Luminex. Панели для проточной цитометрии: день 0=живые/мертвые, CD45, ЕрСАМ, нектин-4, CD3, CD4, CD8, CD137; день 2=живые/мертвые, CD45, ЕрСАМ, нектин-4, CD3, CD8, Ki67 и счетные шарики. Данные проточной цитометрии анализируют с помощью программного обеспечения Flowjo.

Данные, представленные на фиг. 8, демонстрируют, что гетеротандемы нектин-4/CD137 индуцируют зависимое от мишени высвобождение цитокинов в культурах *ex vivo* первичных опухолей легких, полученных от пациента. Обработка BCY10572 индуцировала зависимое от нектин-4 изменение нескольких иммунных маркеров (нормализованных на носитель) и % CD8⁺ki67⁺ Т-клеток в образцах, полученных от пациентов.

8. Фармакокинетика CD137-биспецифических бициклов у крыс SD

Самцам крыс SD вводили по 2 мг/кг каждого бициклического мультимера в буфере, содержащем 25 мМ гистидин-НCl, 10% сахарозы, pH 7. Серийное забор образцов крови (около 80 мкл крови/на временную точку) проводили через субмадибулярную или подкожную вену в каждый заданный момент времени. Все образцы крови немедленно переносили в предварительно охлажденные микроцентрифужные пробирки, содержащие 2 мл K2-EDTA (0,5 М) в качестве антикоагулянта, и помещали в воду со льдом. Образцы крови немедленно процессировали для получения плазмы, центрифугируя при приблизительно 4°C, 3000 g. Осадок, включающий внутренний стандарт, немедленно добавляли в плазму, хорошо перемешивали и центрифугировали при 12000 об/мин, 4°C в течение 10 минут. Супернатант переносили в предварительно маркированные полипропиленовые микроцентрифужные пробирки, а затем быстро замораживали на сухом льду. Образцы хранили при 70°C или ниже как необходимо для анализа. 7,5 мкл образцов супернатанта использовали напрямую для впрыскивания в анализе ЖХ-МС/МС с использованием Orbitrap Q Exactive в режиме положительных ионов для определения концентраций бициклического мультимера. Данные о зависимости концентрации в плазме от времени анализировали с помощью некомпартментных подходов с использованием программы Phoenix WinNonlin 6.3. Приведены данные о C₀, C₁, V_{dss}, T_{1/2}, AUC(0-последн.конц), AUC(0-бескон.), MRT(0-последн.конц), MRT(0-бескон.) и графики зависимости концентрации в плазме от времени.

На фигуре 10 показана зависимость концентрации в плазме от времени для BCY10572 и BCY10000 при внутривенном введении 2 мг/кг крысам SD (n=3). Фармакокинетические параметры эксперимента показаны в таблице 7:

Таблица 7: фармакокинетические параметры зависимости концентрации в

плазме от времени для ВСУ10572 и ВСУ10000

Соединение	T_{1/2}(ч)	Плазматический клиренс (CL_p, мл/мин/кг)	Объем распределения (V_{dss}, л/кг)
ВСУ10000	0,357	16,1	0,395
ВСУ10572	0,926	15,6	0,882

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, содержащий:

(a) первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом иммунной клетки; конъюгированный через линкер со

(b) вторым пептидным лигандом, который связывается с компонентом раковой клетки; где каждый из указанных пептидных лигандов включает полипептид, содержащий по крайней мере три остатка цистеина, разделенных по меньшей мере двумя последовательностями петель, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с цистеиновыми остатками полипептида, так что на молекулярном каркасе образуются по меньшей мере две полипептидные петли.

2. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.1, в котором иммунную клетку выбирают из: лейкоцитов; лимфоцитов (например, Т-лимфоцитов или Т-клеток, В-клеток или естественных клеток-киллеров); CD8- или CD4-клеток; CD8-клеток; дендритных клеток, фолликулярных дендритных клеток и гранулоцитов.

3. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.1 или 2, в котором компонент, присутствующий на иммунной клетке, представляет собой CD137.

4. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.1-3, в котором первый пептидный лиганд включает связывающий CD137 бициклический пептидный лиганд.

5. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.4, в котором связывающий CD137 бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

C_i IEEGQYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 1);

C_i [tBuAla]PE[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 3);

C_i IEEGQYC_{ii}F[D-Ala]DPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 4);

C_i [tBuAla]PK[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 5);

C_i [tBuAla]PE[D-Lys]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 6);

C_i [tBuAla]P[K(PYA)][D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 7);

C_i [tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 8);

C_i IEE[D-Lys(PYA)]QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 9); и

[dC_i][dI][dE][dE][K(PYA)][dQ][dY][dC_{ii}][dF][dA][dD][dP][dY][dNle][dC_{iii}] (SEQ ID NO: 10);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, Nle представляет собой норлейцин, tBuAla представляет собой трет-бутилаланин, PYA представляет собой 4-пентиновую кислоту, или их фармацевтически приемлемую соль.

6. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.5, в котором связывающий CD137 бициклический пептидный лиганд содержит N- и C-концевые модификации и содержит:

Ac-A-(SEQ ID NO: 1)-Dap (далее обозначается как BCY7732);

Ac-A-(SEQ ID NO: 1)-Dap(PYA) (далее обозначается как BCY7741);
 Ac-(SEQ ID NO: 3)-Dap (далее обозначается как BCY9172);
 Ac-(SEQ ID NO: 3)-Dap(PYA) (далее обозначается как BCY11014);
 Ac-A-(SEQ ID NO: 4)-Dap (далее обозначается как BCY8045);
 Ac-(SEQ ID NO: 5)-A (далее обозначается как BCY8919);
 Ac-(SEQ ID NO: 6)-A (далее обозначается как BCY8920);
 Ac-(SEQ ID NO: 7)-A (далее обозначается как BCY8927);
 Ac-(SEQ ID NO: 8)-A (далее обозначается как BCY8928);
 Ac-A-(SEQ ID NO: 9)-A (далее обозначается как BCY7744); и
 Ac-[dA]-(SEQ ID NO: 10)-[dA]-NH₂ (далее обозначается как BCY11506);

где Ac представляет собой ацетильную группу, Dap представляет собой диаминопропионовую кислоту, и PYA представляет собой 4-пентиновую кислоту, или их фармацевтически приемлемую соль.

7. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.1-6, в котором раковую клетку выбирают из опухолевых клеток HT1080, SC-OV-3, PC3, H1376, NCI-H292, LnCap, MC38 и RKO.

8. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.1-7, где компонент, присутствующий на раковой клетке, представляет собой EphA2.

9. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.1-8, где второй пептидный лиганд включает связывающий EphA2 бициклический пептидный лиганд.

10. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.9, в котором связывающий EphA2 бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 2); и
 C_iLWDPTPC_{ii}ANLHL[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 11);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, HyP представляет собой гидроксипролин, dD представляет собой аспарагиновую кислоту в D-конфигурации, и HArg представляет собой гомоаргинин, или их фармацевтически приемлемую соль.

11. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.10, в котором связывающий EphA2 бициклический пептидный лиганд содержит N-концевые модификации и содержит:

A-HArg-D-(SEQ ID NO: 2) (далее обозначается как BCY9594);
 [B-Ala]-[Sar₁₀]-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 2) (далее обозначается как BCY6099);
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 2) (далее обозначается как BCY6169); и
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-VGP-(SEQ ID NO: 11) (далее обозначается как BCY8941);

где HArg представляет собой гомоаргинин, PYA представляет собой 4-пентиновую кислоту, Sar₁₀ представляет собой 10 саркозиновых звеньев, B-Ala представляет собой

бета-аланин, или их фармацевтически приемлемую соль.

12. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.9-11, который представляет собой CD137/EphA2-комплекс, выбранный из: BCY9173, BCY7985, BCY8942, BCY8943, BCY9647, BCY9648, BCY9655, BCY9656, BCY9657, BCY9658, BCY9659, BCY9758, BCY10568, BCY10570, BCY10574, BCY10575, BCY10576 и BCY10577.

13. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.1-7, в котором компонент, присутствующий в раковой клетке, представляет собой PD-L1.

14. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.1-7 и 13, в котором второй пептидный лиганд включает связывающий PD-L1 бициклический пептидный лиганд.

15. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.14, в котором связывающий PD-L1 бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

C_i [HArg]DWC_{ii}HWTFSHGHPC_{iii} (SEQ ID NO: 12);

C_i SAGWLTMC_{ii}QKLHLC_{iii} (SEQ ID NO: 13); и

C_i SAGWLTMC_{ii}Q[K(PYA)]LHLC_{iii} (SEQ ID NO: 14);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, HArg представляет собой гомоаргинин, и PYA представляет собой 4-пентиновою кислоту, или их фармацевтически приемлемую соль.

16. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.15, в котором связывающий PD-L1 бициклический пептидный лиганд содержит N-концевые и/или C-концевые модификации и содержит:

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]- (SEQ ID NO: 12) (далее обозначается как BCY8938);

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-SDK- (SEQ ID NO: 13) (далее обозначается как BCY10043);

NH₂-SDK- (SEQ ID NO: 13)-[Sar₁₀]-[K(PYA)] (далее обозначается как BCY10044);

NH₂-SDK- (SEQ ID NO: 14) (далее обозначается как BCY10045); и

Ac-SDK- (SEQ ID NO: 14)-PSH (далее обозначается как BCY10861);

где PYA представляет собой 4-пентиновою кислоту, B-Ala представляет собой бета-аланин, Sar₁₀ представляет собой 10 саркозиновых звеньев, или их фармацевтически приемлемую соль.

17. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп. 14-16, который представляет собой CD137/PD-L1-комплекс, выбранный из: BCY8939, BCY10580, BCY10581, BCY10582, BCY11017, BCY11018, BCY11019, BCY11376, BCY11377, BCY11378, BCY11379, BCY11380 и BCY11381.

18. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.1-7, в котором компонент, присутствующий на раковой клетке, представляет собой нектин-4.

19. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.1-7 и 18, в котором второй пептидный лиганд включает связывающий нектин-4 бициклический пептидный лиганд.

20. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.19, в котором связывающий нектин-4 бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

$C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 15; далее обозначается как BCY8116);

$C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HAArg]D[dW]STP[HyP][dW]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 16; далее обозначается как BCY11415); и

$C_iP[1Nal][dK](Sar_{10}-(B-Ala))C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 17);

$C_iPFGC_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 18; далее обозначается как BCY11414);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, 1Nal представляет собой 1-нафтилаланин, HAArg представляет собой гомоаргинин, HyP представляет собой гидроксипролин, B-Ala представляет собой бета-аланин, или их фармацевтически приемлемую соль.

21. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.20, в котором связывающий нектин-4 бициклический пептидный лиганд необязательно содержит N-концевые модификации и содержит:

SEQ ID NO: 15 (далее обозначается как BCY8116);

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]- (SEQ ID NO: 15) (далее обозначается как BCY8846);

SEQ ID NO: 16 (далее обозначается как BCY11415);

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]- (SEQ ID NO: 16) (далее обозначается как BCY11942);

Ac- (SEQ ID NO: 17) (далее обозначается как BCY8831); и

SEQ ID NO: 18 (далее обозначается как BCY11414);

где PYA представляет собой 4-пентиновую кислоту, B-Ala представляет собой бета-аланин, Sar₁₀ представляет собой 10 саркозиновых звеньев, или их фармацевтически приемлемую соль.

22. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.19-21, который представляет собой CD137/нектин-4-комплекс, выбранный из: BCY8854, BCY9350, BCY9351, BCY9399, BCY9400, BCY9401, BCY9403, BCY9405, BCY9406, BCY9407, BCY9408, BCY9409, BCY9410, BCY9411, BCY9759, BCY10000, BCY10567, BCY10569, BCY10571, BCY10572, BCY10573, BCY10578, BCY10917, BCY11020, BCY11373, BCY11374, BCY11375, BCY11616, BCY11617, BCY11857, BCY11858 и BCY11859.

23. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.1-7, в котором компонент, присутствующий в раковой клетке, представляет собой PSMA.

24. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.1-7 и 23, в котором второй пептидный лиганд включает связывающий PSMA бициклический пептидный лиганд.

25. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп. 1-24, в котором линкер выбирают из: -CH₂-, -PEG₅-, -PEG₁₀-, -PEG₁₂-, -PEG₂₃-, -PEG₂₄-, -PEG₁₅-

Sar₅-, -PEG₁₀-Sar₁₀-, -PEG₅-Sar₁₅-, -PEG₅-Sar₅-, -B-Ala-Sar₂₀-, -B-Ala-Sar₁₀-PEG₁₀-, -B-Ala-Sar₅-PEG₁₅- и -B-Ala-Sar₅-PEG₅-.

26. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.1-25, в котором молекулярный каркас выбирают из 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-она (ТАТА).

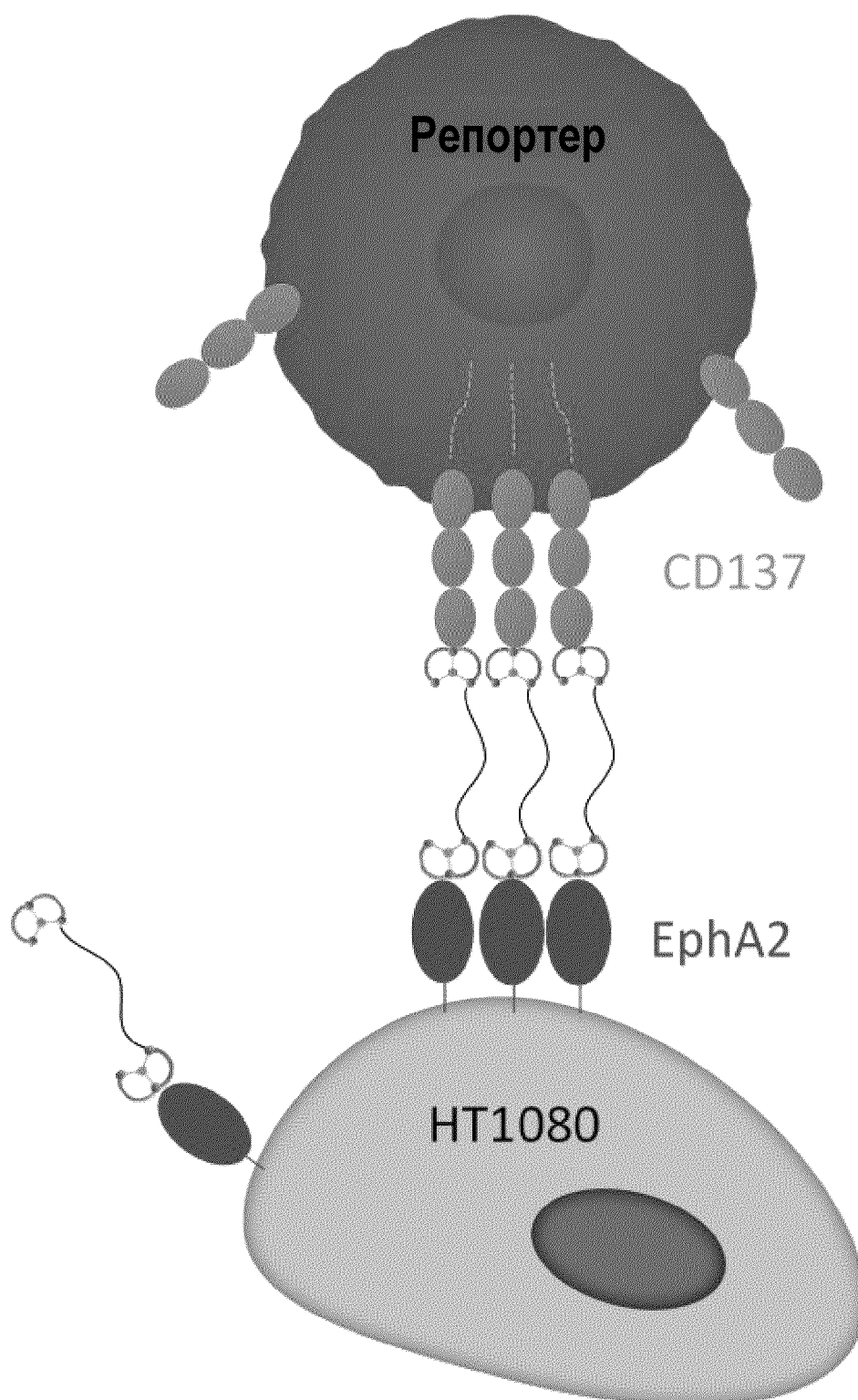
27. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.1-26, в котором фармацевтически приемлемую соль выбирают из свободной кислоты или натриевой, калиевой, кальциевой, аммониевой соли.

28. Фармацевтическая композиция, которая содержит гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп. 1-27 в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

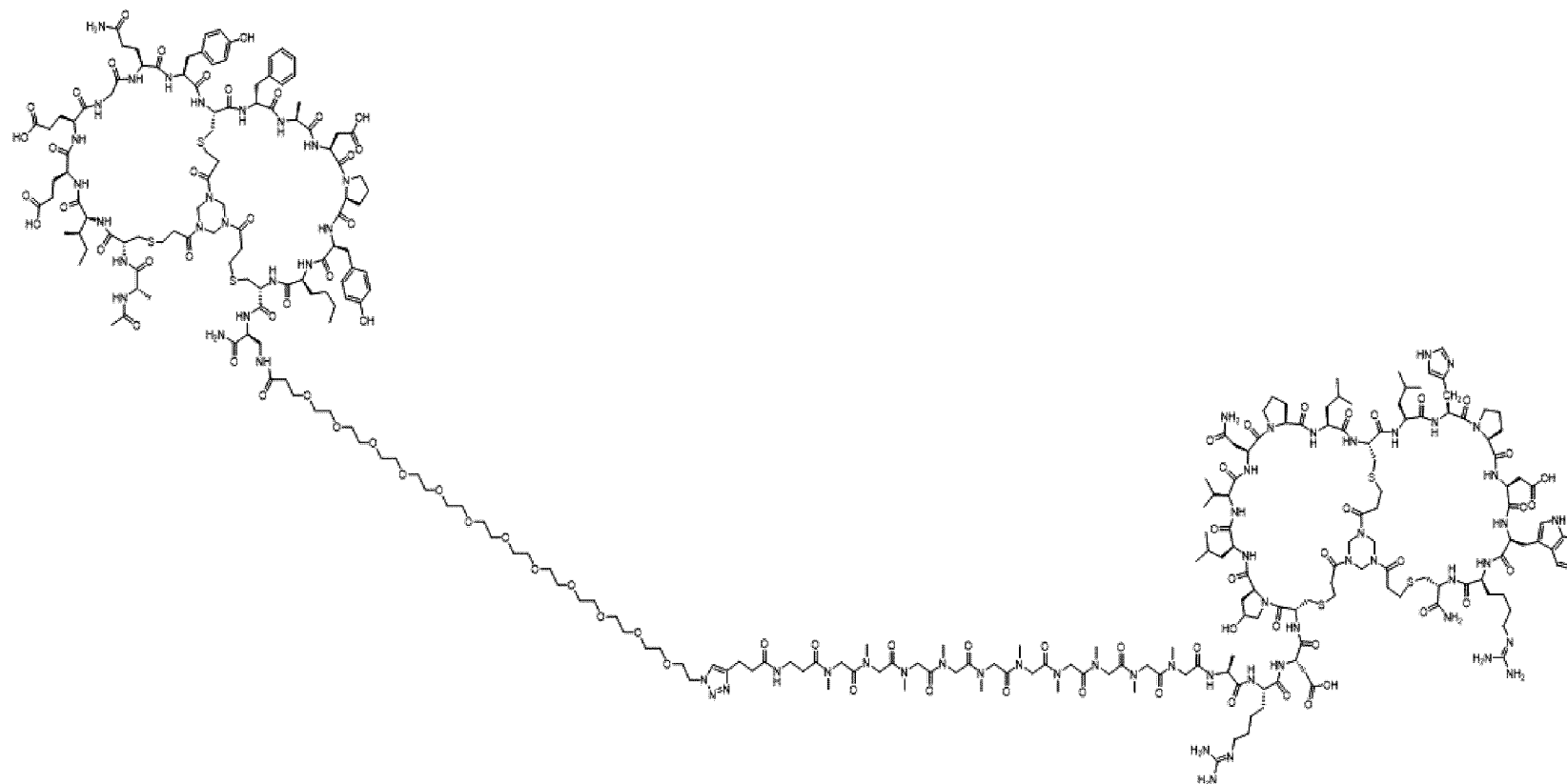
29. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп.1-27 для применения в профилактике, подавлении или лечении рака.

По доверенности

ФИГ.1



ФИГ.2

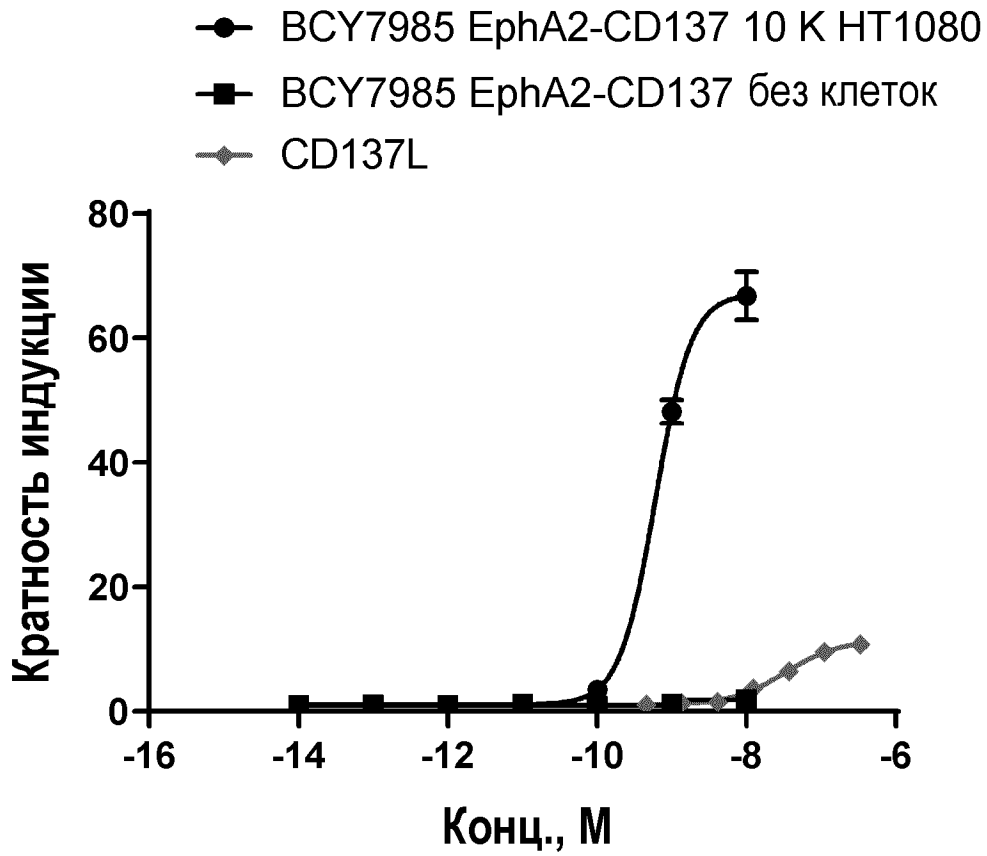


Связывающий CD137
компонент
(С-концевой)

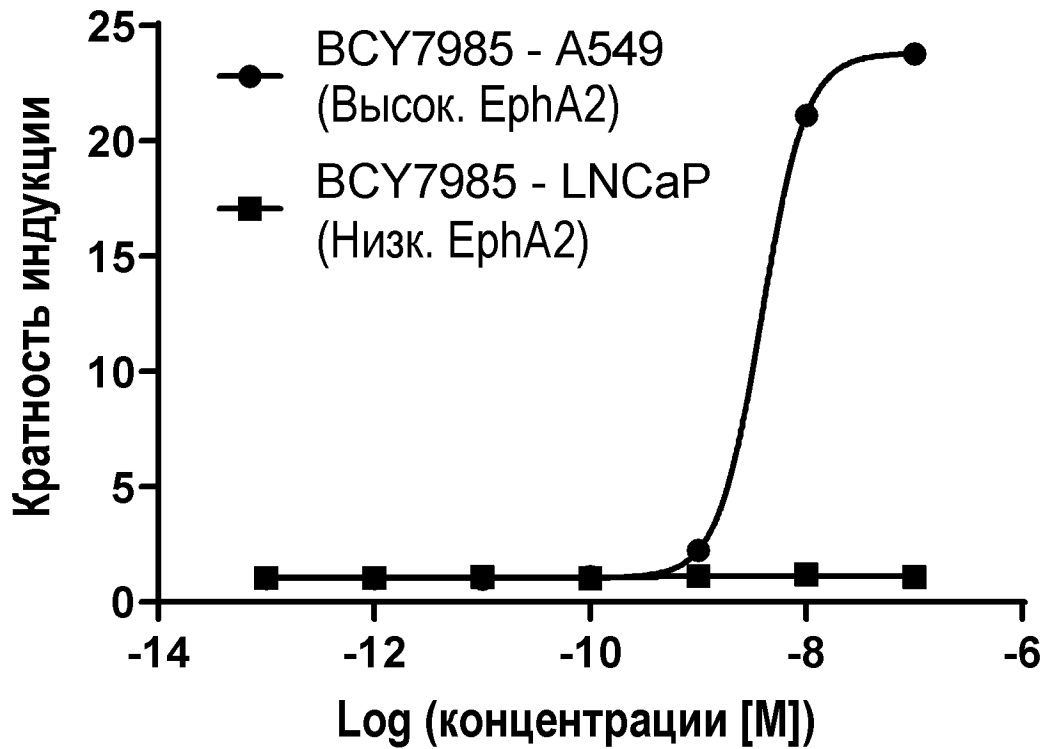
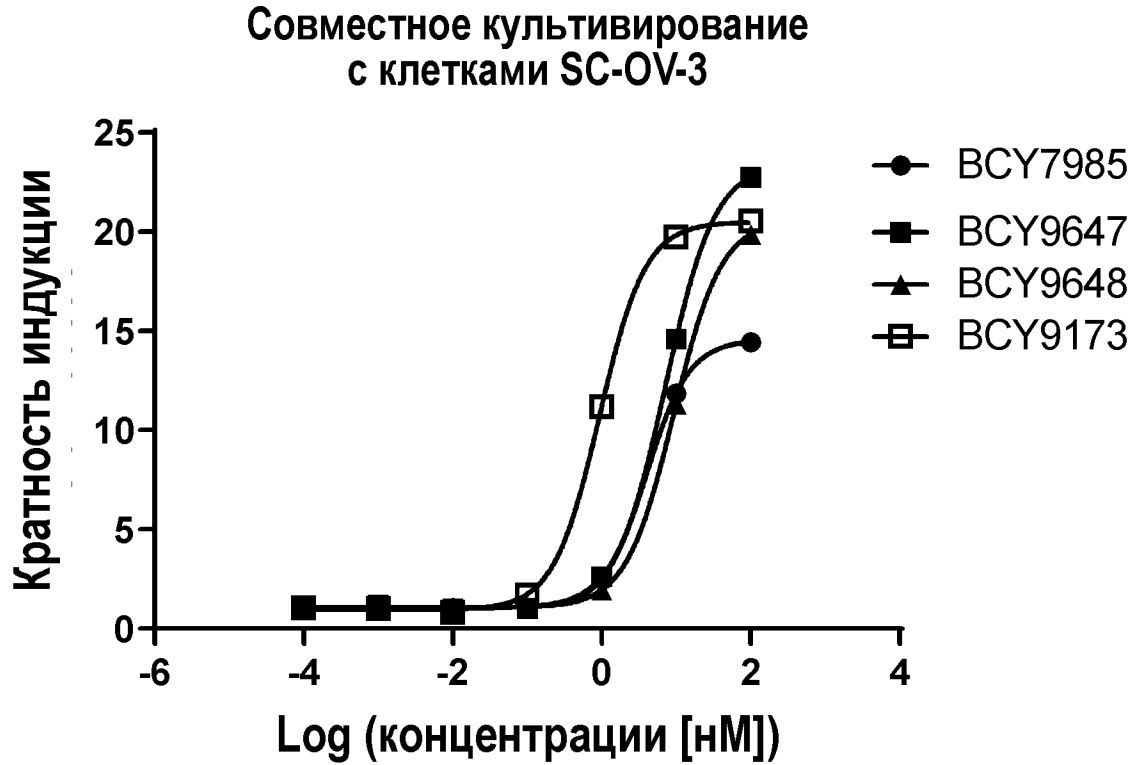
ПЭГ12

Связывающий EphA2 компонент
(BCY6196=6099 пептидная последовательность - Sar10
спейсер N-концевая связь)

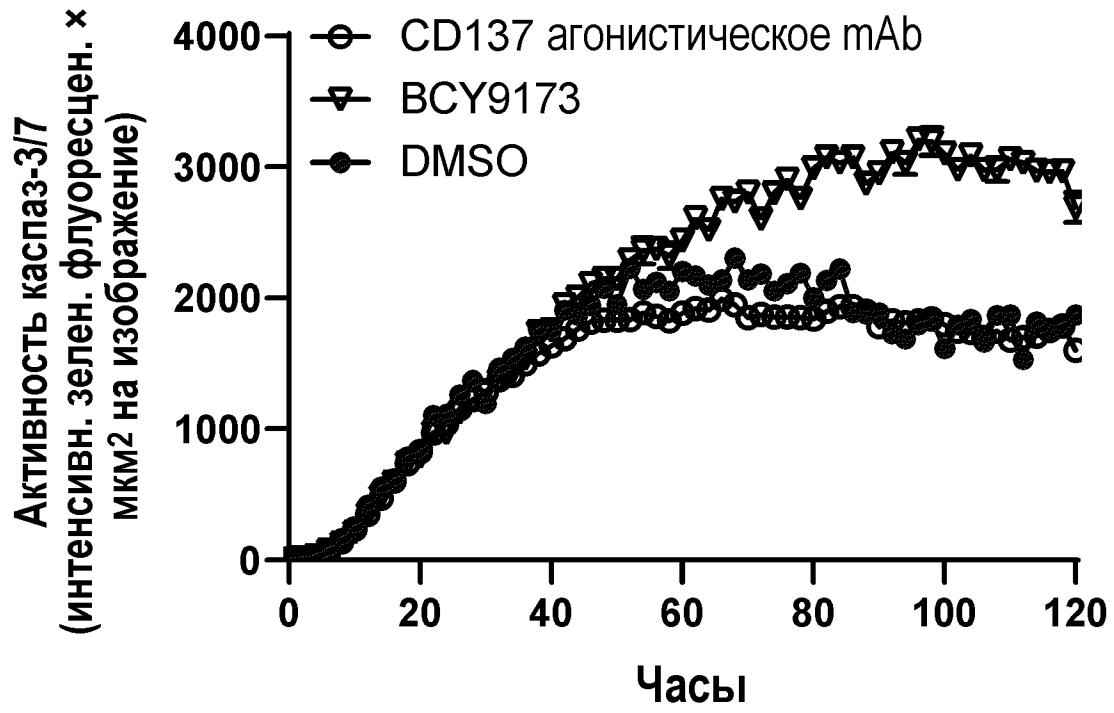
ФИГ.3



ФИГ.4

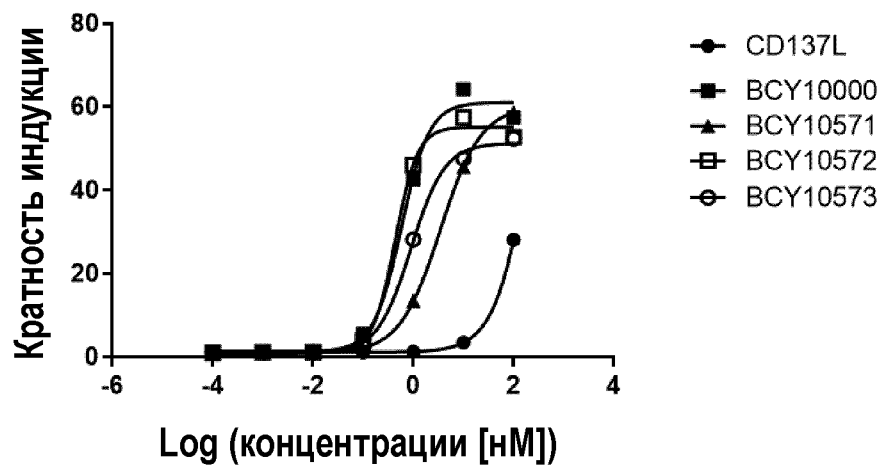


ФИГ.5

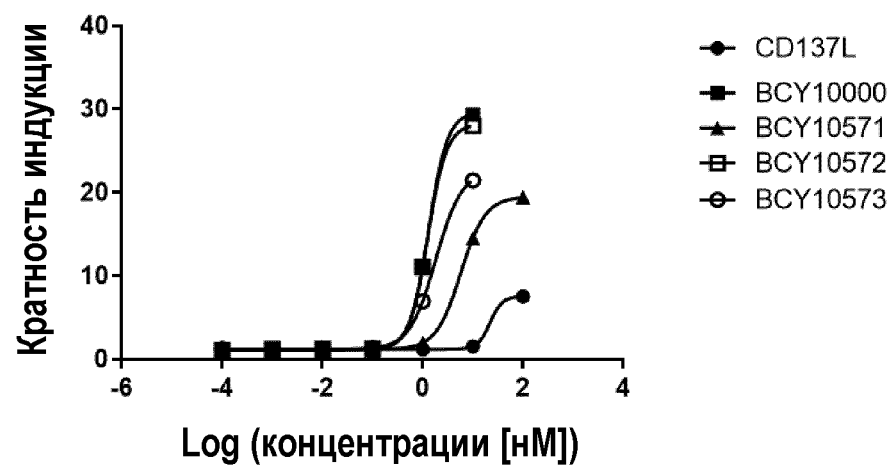


ФИГ.6

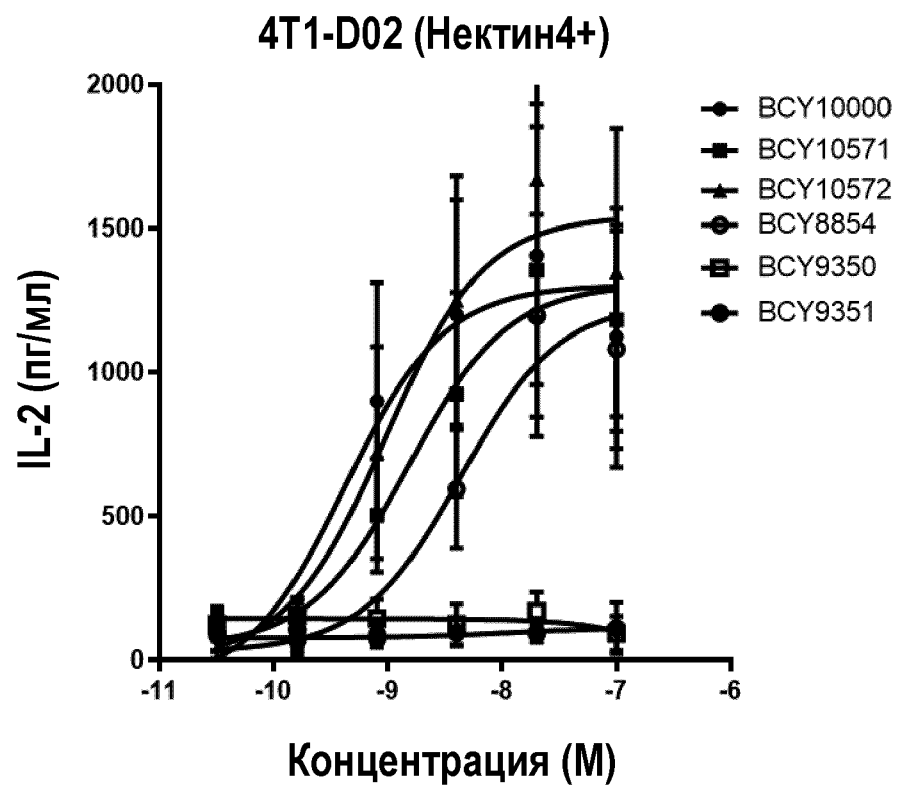
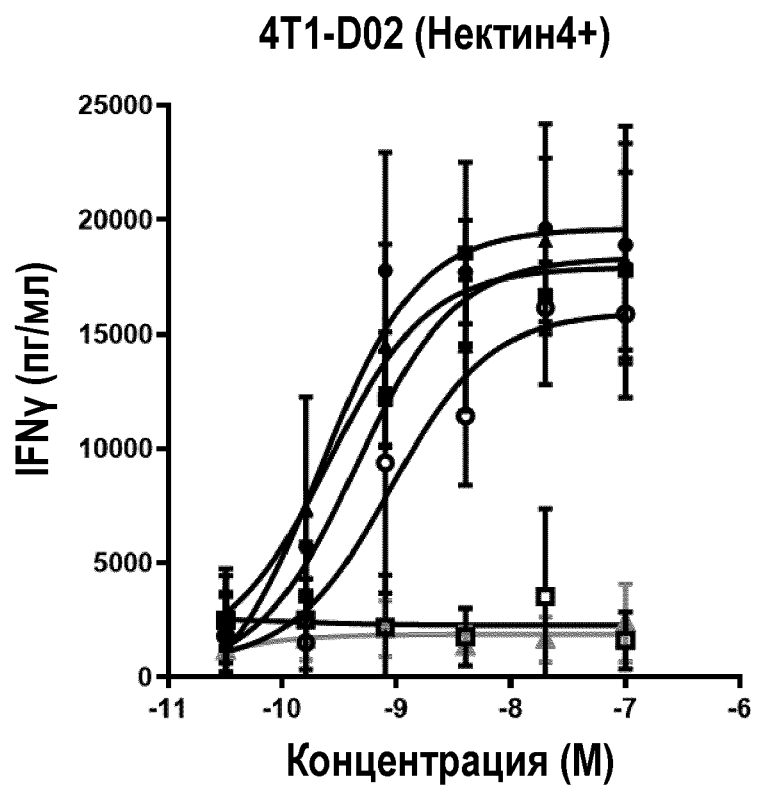
Совместное культивирование
с клетками HT1376 (высок. нектин-4)

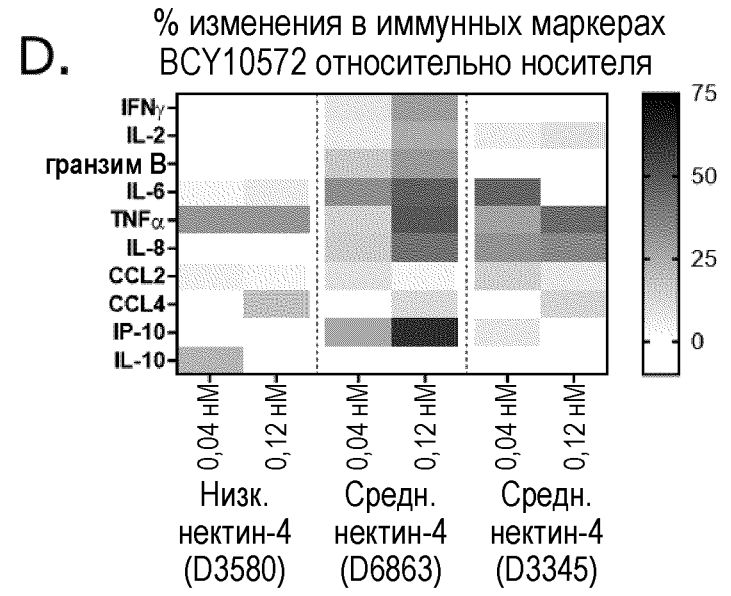
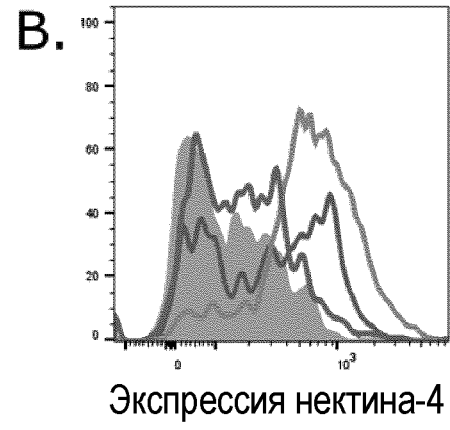
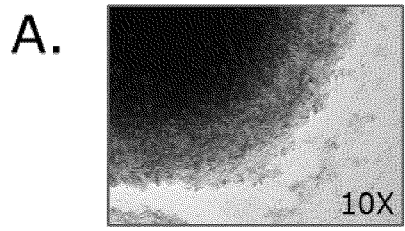


Совместное культивирование
с клетками NCI-H292 (средн. нектин-4)



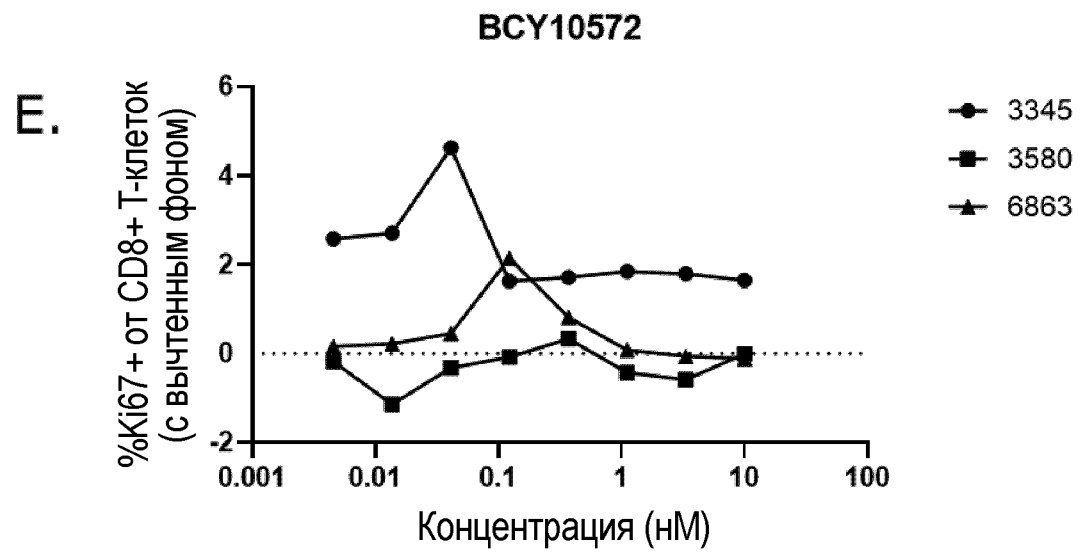
ФИГ.7





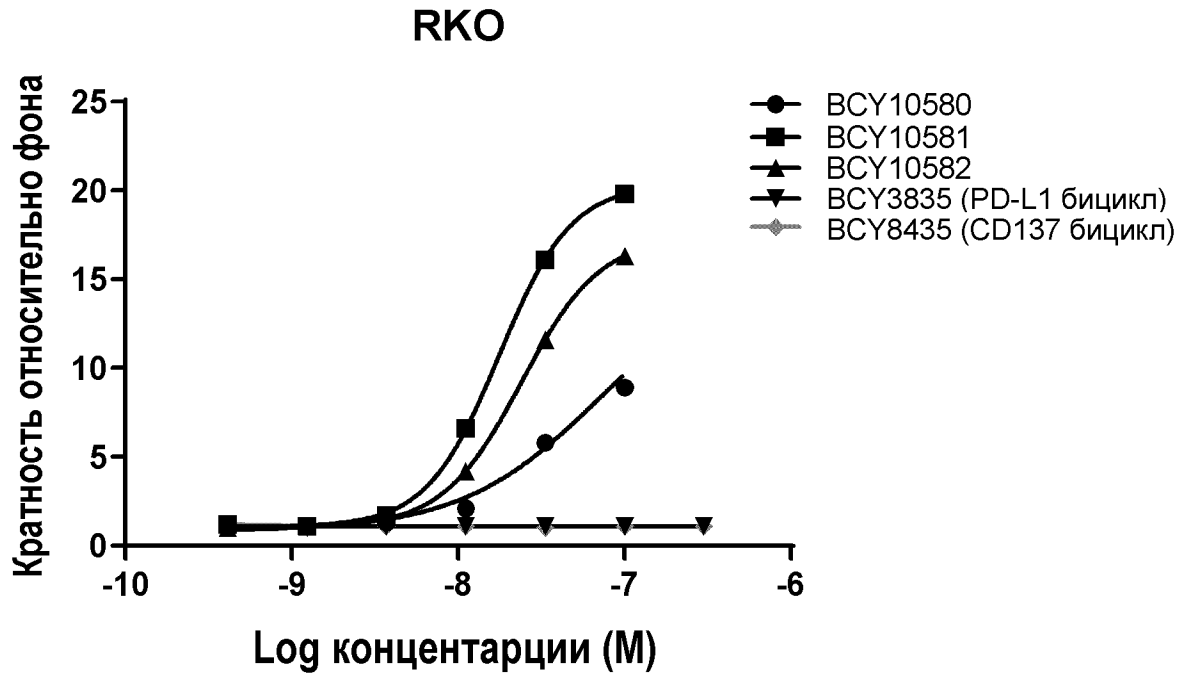
C.

ID пациента:	110003580	110006863	110003345
% CD137+ Т-клеток	19.8	30.0	15.1
% нектин-4+ Т-клеток	4.4	15.1	25.8



ФИГ.8

ФИГ.9



ФИГ.10

