



(51) МПК

C07D 207/452 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01)

A61K 47/55 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014132830, 24.01.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.01.2013Дата регистрации:
06.07.2017

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

27.01.2012 US 61/591,295;

12.07.2012 US 61/670,666

(43) Дата публикации заявки: 27.03.2016 Бюл. № 9

(45) Опубликовано: 06.07.2017 Бюл. № 19

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 27.08.2014

(86) Заявка РСТ:

EP 2013/051275 (24.01.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2013/110680 (01.08.2013)

Адрес для переписки:

197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-
ПАТЕНТ", М.В. Хмара

(72) Автор(ы):

ГУДНАУ Дж. Роберт Алан (US),
ГАМИЛЬТОН Мэтью Майкл (US),
СИДДУРИ Ачютаро (US)

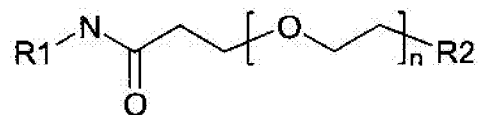
(73) Патентообладатель(и):

Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

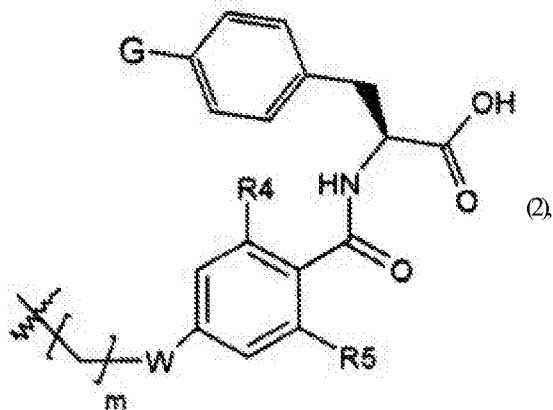
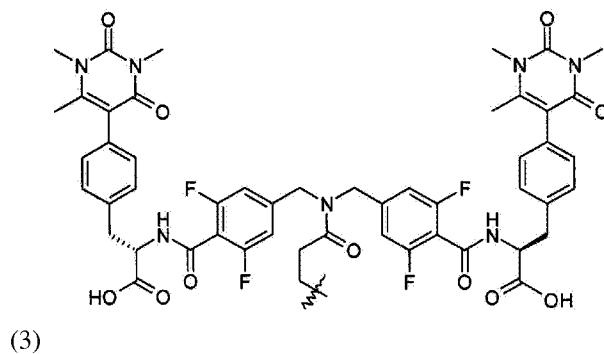
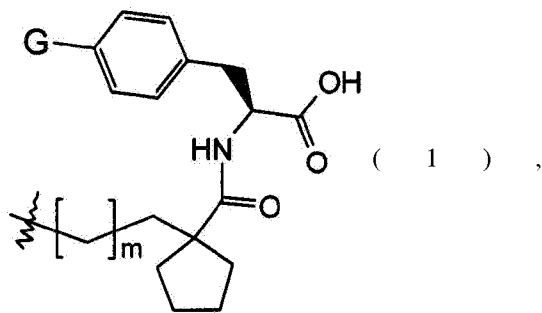
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2266901 C2, 27.12.2005. RU
2270193 C2, 20.02.2006. SHA ZHONG ET AL:
"Leucine-Aspartic Acid-Valine Sequence as
Targeting Ligand and Drug Carrier for
Doxorubicin Delivery to Melanoma Cells: In
Vitro Cellular Uptake and Cytotoxicity
Studies", PHARMACEUTICAL RESEARCH,
2009, vol. 26, no. 12, pages 2578-2587.
ACHYUTHARAO SIDDURI ET AL: (см.
прод.)(54) КОНЬЮГАТЫ АНТАГОНИСТОВ ИНТЕГРИНА ДЛЯ НАЦЕЛЕННОЙ ДОСТАВКИ К КЛЕТКАМ,
ЭКСПРЕССИРУЮЩИМ VLA-4

(57) Реферат:

Изобретение относится к соединениям формулы I, где R1 выбран из группы, состоящей из соединений формулы (1), формулы (2), формулы (3), для изготовления и доставки конъюгированных молекул, таких как низкомолекулярные вещества, пептиды, нуклеиновые кислоты, флуоресцирующие молекулы и полимеры, которые связаны с антагонистами интегрин VLA-4, к клеткам-мишеням, экспрессирующим VLA-4. 5 н. и 11 з.п. ф-лы, 6 ил., 5 табл., 14 пр.



формула I



(56) (продолжение):

"N-Aroyl-1-Phenylalanine Derivatives as VCAM/VLA-4 Antagonists", *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS*, 2002 vol. 12, no. 17, pages 2479-2482. RICHARD D. CARPENTER ET AL:

"Selectively Targeting T- and B-Cell Lymphomas: A Benzothiazole Antagonist of [alpha]4 [beta]1 Integrin", *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*, 2009, vol. 52, no. 1, pages 14-19.

R U
2 6 2 4 7 3 1
C 2

R U
2 6 2 4 7 3 1
C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07D 207/452 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)
A61K 47/55 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2014132830, 24.01.2013

(24) Effective date for property rights:
24.01.2013

Registration date:
06.07.2017

Priority:

(30) Convention priority:
27.01.2012 US 61/591,295;
12.07.2012 US 61/670,666

(43) Application published: 27.03.2016 Bull. № 9

(45) Date of publication: 06.07.2017 Bull. № 19

(85) Commencement of national phase: 27.08.2014

(86) PCT application:
EP 2013/051275 (24.01.2013)

(87) PCT publication:
WO 2013/110680 (01.08.2013)

Mail address:
197101, Sankt-Peterburg, a/ya 128, "ARS-PATENT",
M.V. Khmara

(72) Inventor(s):

GUDNAU Dzh. Robert Alan (US),
GAMILTON Metyu Majkl (US),
SIDDURI Achyutarao (US)

(73) Proprietor(s):

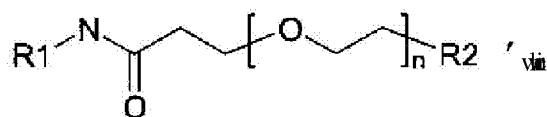
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

(54) **CONJUGATES FOR INTEGRIN ANTAGONIST TARGETED DELIVERY TO CELLS, EXPRESSING LFA-1**

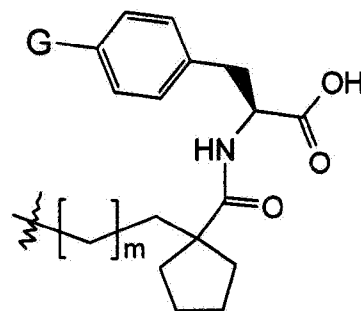
(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to compounds of formula I



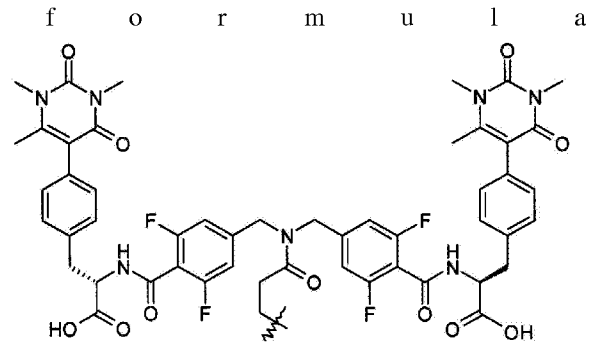
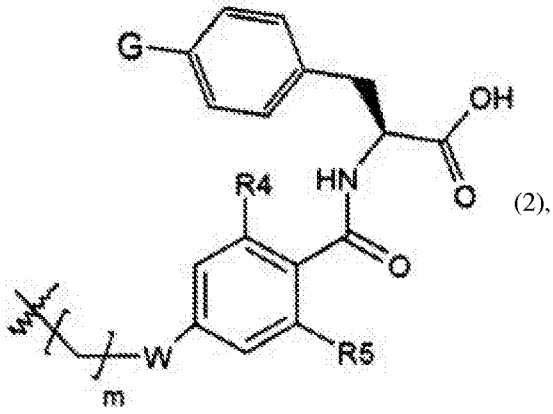
R1 is selected from the group consisting of formula



(1), formula

C 2
1
7
3
1
2
6
2
4
7
3
1
C 2
R U

R U
2
6
2
4
7
3
1
C 2



(3), for the manufacture and delivery of conjugated molecules, such as small molecules, peptides, nucleic acids, fluorescent molecules and polymers that are associated with the integrin antagonists of VLA-4, target cells expressing VLA-4.

EFFECT: improved properties of compounds.

16 cl, 6 dwg, 5 tbl, 14 ex

R U 2 6 2 4 7 3 1 C 2

R U 2 6 2 4 7 3 1 C 2

Настоящее изобретение относится к синтезу и взаимодействию эффективных и селективных низкомолекулярных антагонистов интегрина, содержащих подходящие линкеры и функциональные группы для химической реакции с другими молекулами, содержащими реакционно-способные нуклеофильные группы, например тиольные группы, для образования ковалентной связи между молекулой, которую нужно конъюгировать, и нацеливающим фрагментом. Низкомолекулярные нацеливающие антагонисты связываются с распознаваемыми ими системами рецепторов, как, например, антагонисты VLA-4 с димером VLA-4 (как антагонисты $\alpha 4\beta 1$ с интегрином $\alpha 4\beta 1$, известным также как димерный белок Very Late Antigen-4). Ковалентно связанный радикал включает низкомолекулярные терапевтические вещества, полимеры, пептиды и олигонуклеотиды. Сюда входят 5'-тиосодержащие олигонуклеотиды для получения производных 5'-тио-миРНК в качестве средств для обеспечения нацеленной доставки указанных миРНК. Такие дериватизированные миРНК в составе конъюгата с подходящими агентами для трансфекции способствуют селективной доставке миРНК в клетки, экспрессирующие такие рецепторы интегрина, таким образом предотвращая экспрессию целевых генов за счет РНК-интерференции (РНКи).

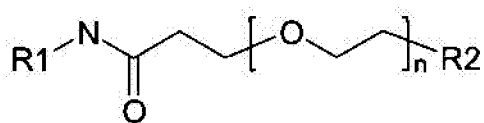
VLA-4 (Very Late Antigen-4, называемый также $\alpha 4\beta 1$) представляет собой димерный интегрин. Он составлен из двух субъединиц, состоящих из CD49d (альфа) и CD29 (бета). VLA-4 экспрессируется на плазмменных мембранах лейкоцитов, которые связываются с VCAM-1 на стенках кровеносных сосудов (после активации цитокинами), способствуя адгезии лейкоцитов на эндотелии сосудов (что вносит свой вклад в развитие атеросклероза и других воспалительных заболеваний). Раковые клетки определенных типов также могут экспрессировать VLA-4, который связывается с VCAM-1, вызывая адгезию таких клеток на эндотелии (что повышает риск метастаза). Таким образом, соединения, которые связываются с VLA-4, могут блокировать взаимодействие с VCAM-1, что потенциально предотвращает или лечит заболевания, опосредованные таким взаимодействием. Или же соединения, связывающиеся с VLA-4, можно применять в фармацевтических композициях для доставки лекарственных веществ, нуклеиновых кислот или других терапевтических соединений к тканям или клеткам, экспрессирующим VLA-4, для лечения или профилактики заболевания.

РНК-интерференция - хорошо известный процесс, при котором трансляция информационной РНК (иРНК) в белок затруднена за счет ассоциации или связывания комплементарных или частично комплементарных олигонуклеотидов, таких как малая интерферирующая РНК (миРНК), короткая шпилечная РНК (кшРНК), микро-РНК (миРНК) или антисмысловые олигонуклеотиды. Молекулы миРНК представляют собой двуспиральные молекулы РНК, длиной обычно в интервале 19-25 нуклеотидов, которые образуют ассоциаты с рядом белков в цитоплазме, известных как RISC (индуцированный РНК комплекс сайленсинга). В конечном итоге RISC разделяет двуспиральную миРНК, давая возможность одной цепи связаться или образовать ассоциат с комплементарным или частично комплементарным участком молекулы иРНК, после чего иРНК разрушается под действием RISC, или ее трансляция предупреждается иным путем, вследствие чего подавляется экспрессия кодируемого белка или продукта гена.

Одна из проблем в использовании нуклеиновых кислот, таких как миРНК, в терапевтических целях (в частности, для систематического введения у человека) заключается в доставке нуклеиновых кислот: (1) к конкретной целевой ткани или типам клеток и (2) к цитоплазме указанных клеток (т.е. туда, где указанная иРНК присутствует и транслируется в белок). Проблема доставки частично обусловлена тем фактом, что нуклеиновые кислоты отрицательно заряжены и легко разрушаются (особенно, если

они не модифицированы), эффективно фильтруются почками, и их нельзя как таковые легко транспортировать в цитоплазму. Таким образом, основная масса исследований сфокусирована на разрешении проблемы доставки с помощью различных носителей и композиций, включая лизосомы, мицеллы, пептиды, полимеры, конъюгаты и аптамеры. См., например: Ling et al, *Advances in Systemic siRNA Delivery*, *Drugs Future* 34(9): 721 (September 2009). Некоторые более перспективные средства доставки включают применение липидных систем, включая липидные наночастицы. См., например: Wu et al., *Lipidic Systems for In Vivo siRNA Delivery*, *AAPS J.* 11(4): 639-652 (December 2009); Международная Заявка на патент № WO 2010/042877, Hope et al ("Improved Amino Lipids And Methods For the Delivery of Nucleic Acids"). Тем не менее, сохраняется необходимость в дальнейшем улучшении нацеленной доставки миРНК; а также в других веществах, таких как низкомолекулярные соединения, пептиды, другие нуклеиновые кислоты, флуоресцирующие молекулы и полимеры, для конкретных целевых клеток и цитоплазмы таких клеток.

Настоящее изобретение относится к соединениям формулы I:



формула I

где R1, R2 и n определены в подробном описании и формуле изобретения. В частности, настоящее изобретение относится к соединениям формулы I для улучшенной доставки конъюгированных молекул, таких как низкомолекулярные вещества, пептиды, нуклеиновые кислоты, флуоресцирующие молекулы и полимеры, к клеткам-мишеням, экспрессирующим димер интегрина $\alpha 4\beta 1$ (Very Late Antigen-4) для различных терапевтических целей и других видов применения. Настоящее изобретение относится также к способам изготовления и применения таких соединений.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

В Табл. 1 представлен состав конкретных дериватизированных по 5'-концу одинарных и двойных цепей миРНК.

В Табл. 2 представлены данные анализа для низкомолекулярных конъюгатов миРНК.

В Табл. 3 представлены последовательности миРНК, в которых 5'-антисмысловая цепь была дериватизирована с помощью Nu547.

В Табл. 4 представлены активности низкомолекулярных конъюгатов миРНК в анализах антагонистов интегрина и данные по КД для миРНК.

В Табл. 5 представлены идентичность, характеристика и связывающая активность меченых изомером FITC реагентов.

На Фиг. 1 представлена гистограмма ("B": Дуплекс-27 500 нМ и соединение из Примера 140, 10 мкМ; "A": Дуплекс-27).

На Фиг. 2 представлен пример отображения захвата миРНК (Дуплекс-27 (500 нМ)).

На Фиг. 3 представлены изображения клеток Jurkat с FITC, конъюгированным с соединением из Примера FITC-5 (LFA-1 антагонист-меченый FITC) при концентрации 10 мкМ.

На Фиг. 4 представлены изображения клеток Jurkat с FITC, конъюгированным с соединением из Примера FITC-14 (VLA-4 антагонист-меченый FITC) в концентрации 10 мкМ. На гистограмме показан сдвиг в присутствии дуплекса миРНК с элементом, нацеливающим на VLA-4. В присутствии антагониста VLA-4 из примера 140, указанный сдвиг оказывается сжатым.

На Фиг. 5 показано снижение экспрессии АНА1 в клетках H1299 при их обработке дуплексами миРНК, которые были дериватизированы по 5'-смысловой цепи с помощью низкомолекулярного соединения, нацеливающего к интегрину. Y-ось отображает наблюдаемый уровень экспрессии АНА1. Более низкий столбик отражает более высокую степень выключения (более высокую степень трансфекции миРНК); высокий столбик - более низкую степень выключения (т.е. более низкую степень трансфекции миРНК). Дуплексы голубого цвета включают нацеливающую модификацию на 5'-конце смысловой цепи; дуплексы розового цвета содержат нацеливающую модификацию на 5'-конце смысловой цепи, а также флюорофор Nu547, присоединенный по 5'-концу антисмысловой цепи.

На Фиг. 6 показаны уровни экспрессии GAPDH иРНК, маркера здоровья клеток. Идентичность уровней экспрессии для тех клеток, которые были обработаны дериватизированной миРНК, по сравнению обработанными холостым образцом и необработанными клетками, говорит об отсутствии токсичности для клеток при используемых концентрациях и длительности обработки.

Если не указано иное, следующие специфические термины и выражения, используемые в описании и формуле изобретения, имеют приведенные ниже определения.

Термин "радикал" обозначает атом или группу химически связанных атомов, которые присоединены к другому атому или молекуле посредством одной или более химических связей, составляя таким образом часть молекулы. Например, переменные R1 и R2 формулы I обозначают радикалы, которые присоединены к структуре, изображенной на формуле I, посредством ковалентной связи, где это указано.

Термин "конъюгированный фрагмент" обозначает структуру, представляющую собой терапевтическое средство или полезное соединение, пептид, полимер, низкомолекулярное вещество, флюоресцирующую молекулу, олигонуклеотид или нуклеиновую кислоту. Примерами являются лекарственные вещества, терапевтические пептиды, антисмысловые олигонуклеотиды, миРНК и флюоресцеинизотиоцианат (FITC).

Если не указано иное, термин "водород" или "гидро" обозначает радикал, состоящий из атома водорода (-H), а не H₂.

Термин "галоген" обозначает радикал фтора, хлора, бром или иода.

Термин "алкил" обозначает алифатический насыщенный углеводородный радикал с линейной или разветвленной цепью, включающий от 1 до 25 атомов углерода.

Термин "TFA" обозначает трифторуксусную кислоту.

Если не указано иное, термин "соединение формулы" или "соединения формулы" обозначает любое соединение, выбранное из рода соединений, охватываемых указанной формулой (включая любые фармацевтически приемлемые соль или эфир любого такого соединения, если не указано иное).

Термин "фармацевтически приемлемые соли" обозначает такие соли, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных оснований или свободных кислот, которые не являются нежелательными с биологической или иной точки зрения. Такие соли могут быть образованы неорганическими кислотами, такими как хлороводородная кислота, бромоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и т.п., предпочтительно хлороводородная кислота, и органическими кислотами, такими как уксусная кислота, пропионовая кислота, гликолевая кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, малоновая кислота, салициловая кислота, янтарная кислота, фумаровая кислота, винная кислота, лимонная кислота, бензойная кислота, коричная кислота, миндальная кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, п-толуолсульфоновая кислота,

N-ацетилцистеин и т.п. Кроме того, соли можно получать добавлением неорганического основания или органического основания к свободной кислоте. Соли, образованные неорганическим основанием, включают, без ограничения, соли натрия, калия, лития, аммония, кальция и магния и т.п. Соли, образованные органическими основаниями, включают, без ограничения, соли первичных, вторичных и третичных аминов, замещенных аминов, включая природные замещенные амины, циклические амины и основные ионообменные смолы, такие как изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, этаноламин, лизин, аргинин, N-этилпиперидин, пиперидин, полиаминовые смолы и т.п. В зависимости от природы заместителей, соединения по

5
10

настоящему изобретению могут существовать также в форме цвиттер-ионов. Соединения по настоящему изобретению могут присутствовать в форме фармацевтически приемлемых солей. Соединения по настоящему изобретению могут также присутствовать в форме фармацевтически приемлемых эфиров (т.е., метиловых и этиловых эфиров кислот формулы I для применения в качестве пролекарств).

15

Соединения по настоящему изобретению можно также сольватировать, т.е. гидратировать. Сольватацию можно осуществлять в ходе процесса получения или она может протекать как следствие гигроскопических свойств изначально безводного соединения формулы I (гидратация).

Соединения, которые имеют одинаковую молекулярную формулу, но различаются по природе или последовательности связей составляющих атомов или расположения атомов в пространстве носят название "изомеры". Изомеры, которые различаются по расположению атомов в пространстве, называются "стереоизомеры". Диастереомеры представляют собой стереоизомеры с противоположной конфигурацией при одном или более хиральных центров, которые не являются энантиомерами. Стереизомеры, включающие один или более асимметрических центров, представляющие собой несовместимые друг с другом зеркальные отображения друг друга, носят название "энантиомеры". Если соединение содержит асимметрический центр, например, если атом углерода связан с четырьмя различными группами, возможна пара энантиомеров. Энантиомер можно охарактеризовать по абсолютной конфигурации его

20
25
30
35

асимметрического центра или центров, и она описывается правилами для определения R- и S-конфигурации Канна, Ингольда и Прелонга, или же исходя из того, каким образом данная молекула вращает плоскость поляризованного света, и обозначается как правовращающий или левовращающий (т.е. как (+) или (-)-изомеры, соответственно). Хиральное соединение может существовать как в виде индивидуального энантиомера, так и в виде их смеси. Смесь, содержащая равные части энантиомеров, называется "рацемическая смесь".

Термин "терапевтически эффективное количество" обозначает количество соединения, которое эффективно для предотвращения, облегчения или улучшения симптомов заболевания или удлинения срока жизни субъекта, которому проводят лечение.

40

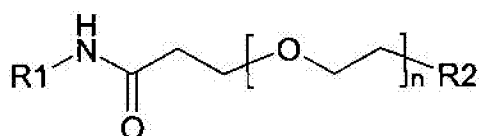
Определение терапевтически эффективного количества находится в компетенции специалиста в данной области техники. Терапевтически эффективное количество или дозировка соединения по настоящему изобретению может изменяться в широких пределах и ее можно определять способом, известным в данной области техники. Такую дозировку следует подбирать в соответствии с индивидуальными требованиями в

45

каждом конкретном случае, включая конкретное вводимое(ые) соединение(я), способ введения, состояние, подлежащее лечению, а также пациента, которому проводят лечение. Суточную дозу можно вводить единственной дозой или разделенными дозами, или, в случае парентерального введения, ее можно вводить путем непрерывной инфузии.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает всевозможные материалы, совместимые с фармацевтическим введением, включая растворители, дисперсионные среды, оболочки, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и агенты, замедляющие абсорбцию и другие материалы и соединения, совместимые с фармацевтическим введением. За исключением тех случаев, когда любая стандартная среда или агент не совместимы с действующим веществом, их применение в композициях по настоящему изобретению рассматривается. В композиции можно также включать дополнительные действующие вещества.

В частности, настоящее изобретение относится к соединениям формулы I:

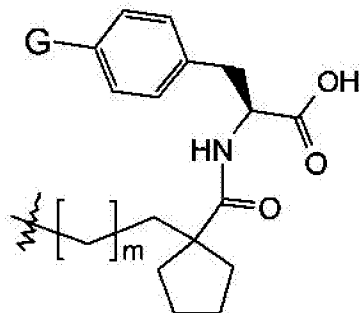


Формула I

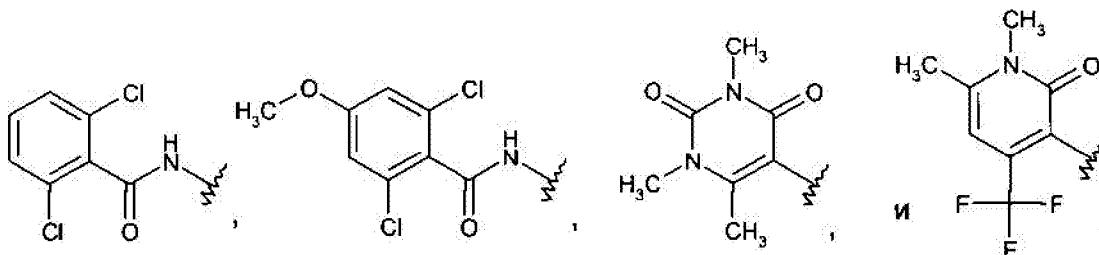
или их фармацевтически приемлемым солям или эфирам; где n равно от 1 до 24 и где:

R1 выбран из группы, состоящей из:

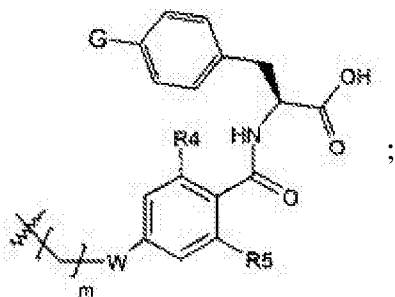
(1) соединения формулы:



где m равно от 0 до 3 и G выбран из группы, состоящей из:

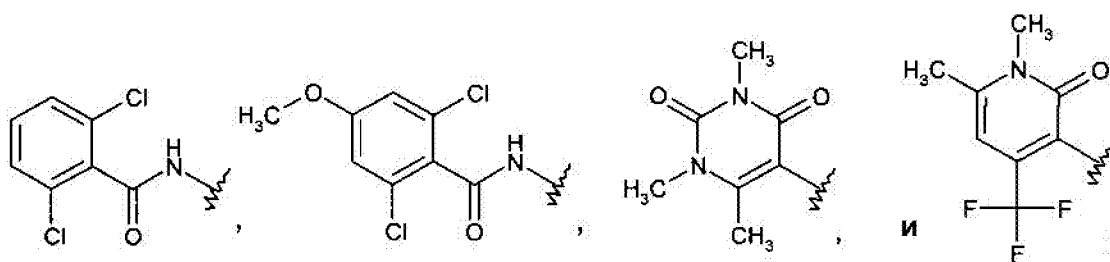


(2) соединения формулы:



где m равно от 0 до 3, R4 и R5 представляют собой независимо водород или галоген, W представляет собой O или CH₂, а G выбран из группы, состоящей из:

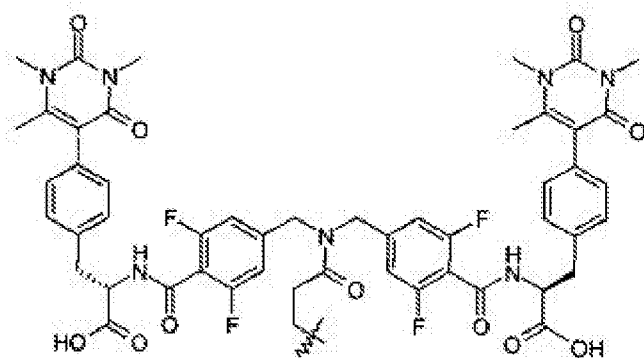
5



и

(3) соединения формулы:

10



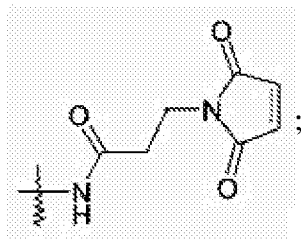
15

20

R2 выбран из группы, состоящей из:

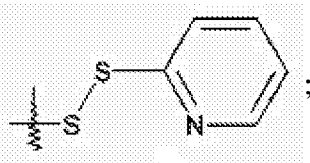
(1) соединения формулы:

25



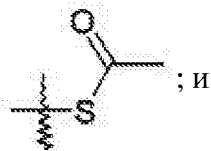
(2) соединения формулы:

30



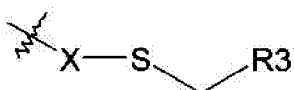
(3) соединения формулы:

35



40

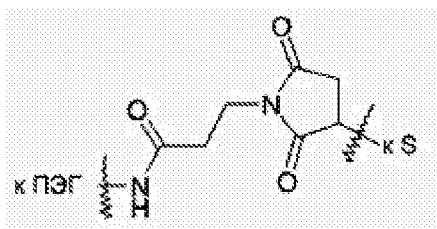
(4) соединения формулы:




45

где R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой либо серу, либо соединение формулы:

5



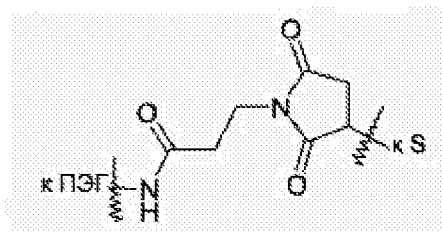
Используемый в приведенных выше структурах символ  указывает на то положение, по которому данная структура или радикал присоединены к основной молекуле посредством ковалентной связи. Кроме того, фраза "к ПЭГ" или "к S" или подобное выражение, используемое в сочетании с указанным выше символом, указывает на то, в каком месте и каким образом данная структура или радикал присоединены к основной молекуле, если имеется несколько возможных положений для присоединения. Например, если R2 представляет собой соединение формулы:

15



где X представляет собой соединение формулы:

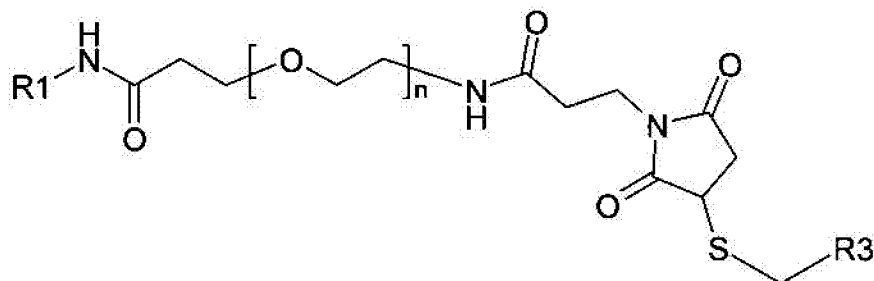
20



25

то структура, соответствующая формуле I, будет следующей:

30



где R1, R3 и n определены в формуле I.

35

Настоящее изобретение относится также к способам изготовления и применения соединений формулы I, а также фармацевтических композиций, содержащих такие соединения. Соединения формулы I полезны для улучшения доставки низкомолекулярных веществ, белков, нуклеиновых кислот, полимеров, флюоресцирующих маркеров и других веществ к клеткам-мишеням, экспрессирующим рецепторы VLA-4. В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к композициям и лекарственным формам, содержащим соединения формулы I, которые полезны для доставки миРНК в цитоплазму клеток-мишеней, экспрессирующих VLA-4 рецепторы, для ингибирования экспрессии конкретных целевых белков за счет РНК-интерференции.

45

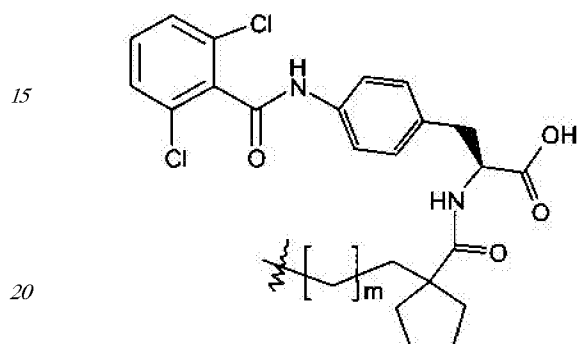
В более частных воплощениях, настоящее изобретение относится к применению соединений формулы I в композициях для облегчения доставки нуклеиновых кислот, таких как миРНК, к опухолевым клеткам и клеткам других типов, экспрессирующим рецепторы VLA-4. Кроме того, частью настоящего изобретения является применение

соединений формулы I в изготовлении композиций для доставки для лечения воспалительных и пролиферативных расстройств, таких как рак.

R1 представляет собой низкомолекулярный антагонист интегрина, который нацеливает соединения формулы I к комплексам рецепторов интегрина VLA-4, облегчая таким образом их доставку к клеткам, которые экспрессируют такие рецепторы.

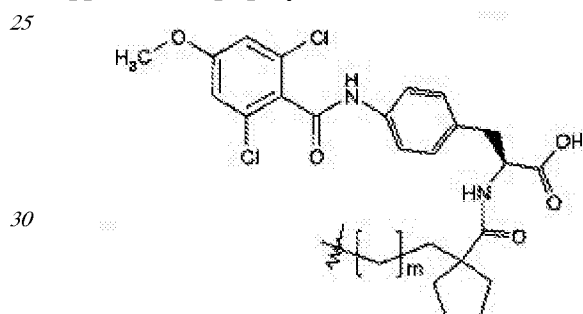
В некоторых воплощениях нацеливающие фрагменты R1 низкомолекулярного антагониста интегрина присоединены по такому положению, чтобы аффинность низкомолекулярного вещества к рецептору интегрина существенно не снижалась, по сравнению со свободным низкомолекулярным антагонистом интегрина. Фрагменты R1 формулы I нацелены к димеру VLA-4 (Интегрин $\alpha 4\beta 1$ или Very Late Antigen-4).

В некоторых воплощениях R1 представляет собой нацеливающий к VLA-4 фрагмент формулы:



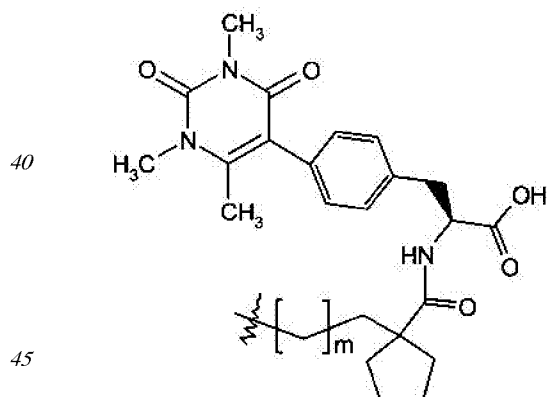
или его фармацевтически приемлемую соль или эфир, где m равно от 0 до 3.

В других частных воплощениях R1 представляет собой нацеливающий к VLA-4 фрагмент формулы:



или его фармацевтически приемлемую соль или эфир, где m равно от 0 до 3.

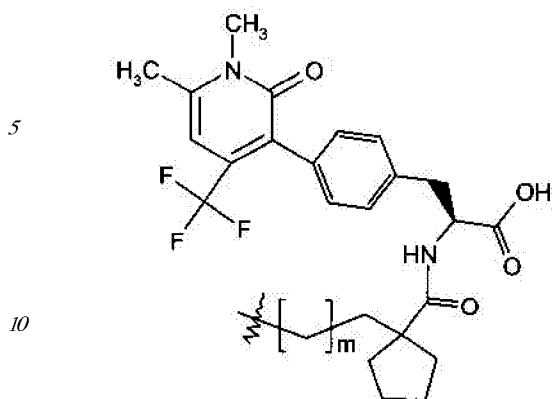
В других частных воплощениях R1 представляет собой нацеливающий к VLA-4 фрагмент формулы:



или его фармацевтически приемлемую соль или эфир, где m равно от 0 до 3.

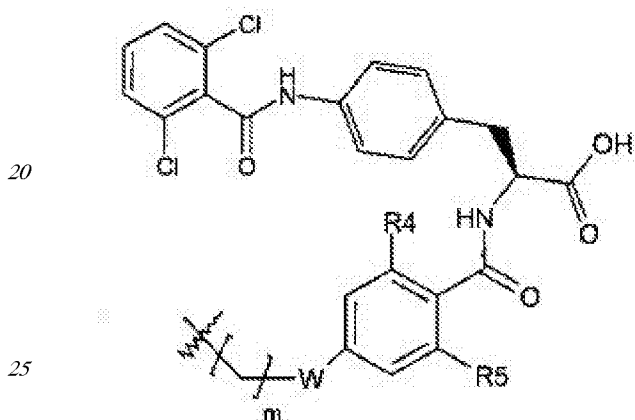
В других частных воплощениях R1 представляет собой нацеливающий к VLA-4

фрагмент формулы:



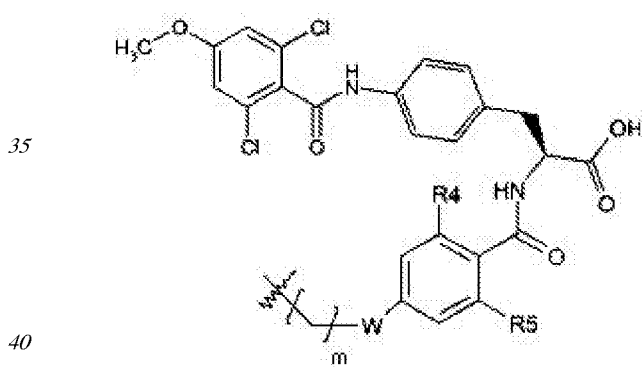
или его фармацевтически приемлемую соль или эфир, где m равно от 0 до 3.

15 В других воплощениях R1 представляет собой нацеливающий к VLA-4 фрагмент формулы:



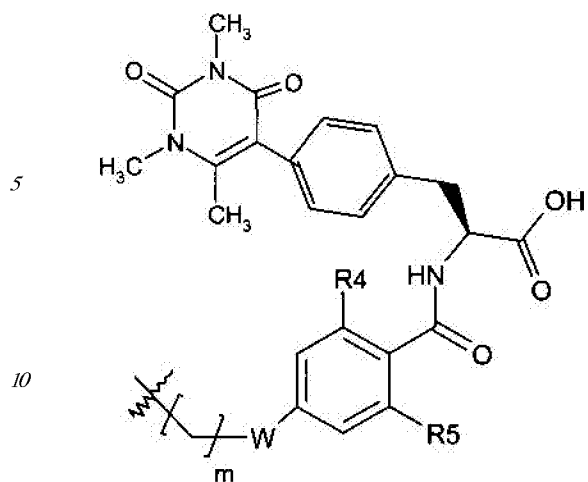
или его фармацевтически приемлемую соль или эфир, где m равно от 0 до 3, R4 и R5 представляют собой водород или галоген, а W представляет собой O или CH₂.

30 В других частных воплощениях R1 представляет собой нацеливающий к VLA-4 фрагмент формулы:



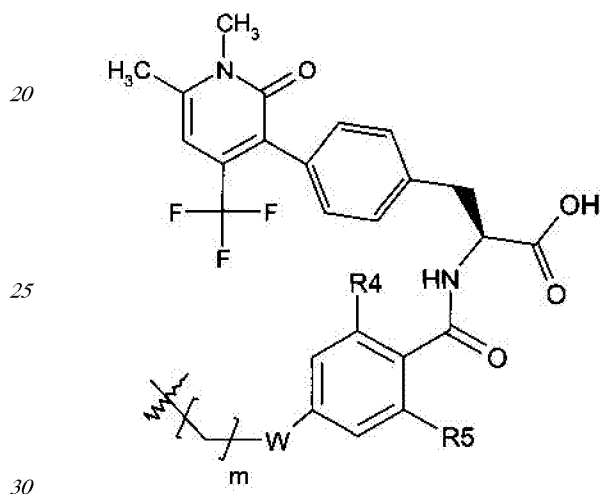
или его фармацевтически приемлемую соль или эфир, где m равно от 0 до 3, R4 и R5 представляют собой водород или галоген, а W представляет собой O или CH₂.

45 В других частных воплощениях R1 представляет собой нацеливающий к VLA-4 фрагмент формулы:



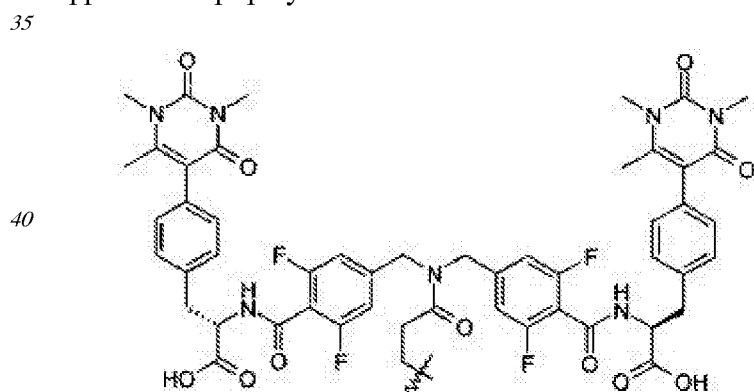
или его фармацевтически приемлемую соль или эфир, где m равно от 0 до 3, R_4 и R_5
15 представляют собой водород или галоген, а W представляет собой O или CH_2 .

В других частных воплощениях R_1 представляет собой нацеливающий к VLA-4
фрагмент формулы:



или его фармацевтически приемлемую соль или эфир, где m равно от 0 до 3, R_4 и R_5
представляют собой водород или галоген и W представляет собой O или CH_2 .

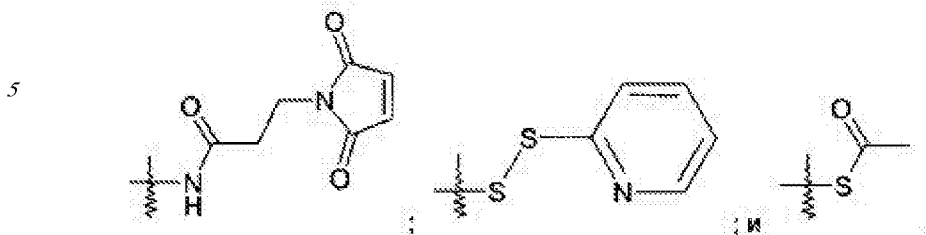
В других частных воплощениях R_1 представляет собой нацеливающий к VLA-4
фрагмент формулы:



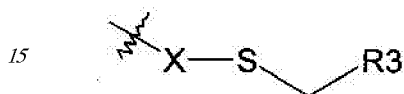
или его фармацевтически приемлемую соль или эфир.

R_2 может представлять реакционноспособные радикалы, которые могут давать
ковалентные связи с терапевтическими или иными полезными соединениями или
конъюгированными фрагментами, содержащими сильные нуклеофилы, например с

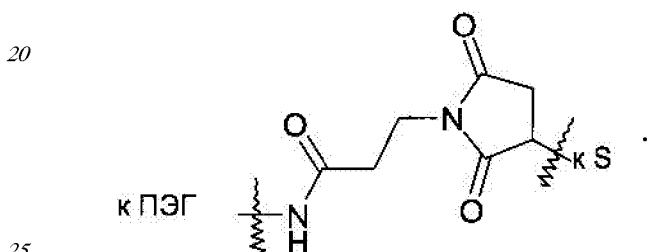
тиол-содержащими фрагментами. Примеры таких реакционноспособных радикалов включают радикалы, выбранные из группы, состоящей из:



10 Как вариант, R2 может представлять собой радикал, который уже присоединен к конъюгированному фрагменту, такому как терапевтическое или другое полезное соединение, белок или олигонуклеотид (R3). В частности, R2 может представлять радикал формулы:



где R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой либо серу, либо соединение формулы:



25 В некоторых воплощениях R3 представляет собой олигонуклеотид. В частных воплощениях R3 представляет собой 5'-конец смысловой цепи молекулы РНК, который может существовать как одинарная цепь или в дуплексе, например молекула миРНК. Такие молекулы миРНК, известные также как агенты РНКи, ингибируют экспрессию

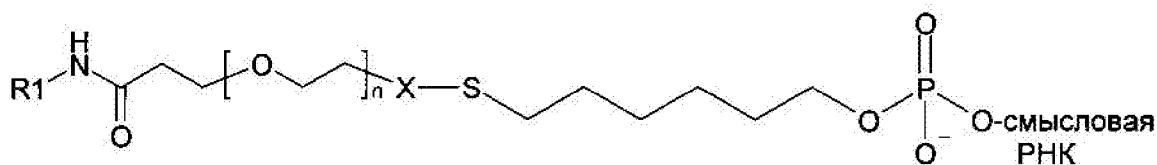
30 целевого гена в клетке. В частных воплощениях R3 представляет собой молекулу миРНК, которая состоит по существу из олигорибонуклеотидной цепи длиной от 15 до 30 нуклеотидов, в которой 5'-конец смысловой олигорибонуклеотидной цепи присоединен к R2, как показано в выше приведенных структурах и комплементарен по меньшей мере одной части иРНК, соответствующей целевому гену. В других

35 воплощениях R3 представляет собой олигонуклеотид ДНК, присоединенный по своему 5'-концу. Такая дериватизированная ДНК может существовать в виде одинарной цепи или одной цепи, гибризованной с комплементарной цепью другого олигонуклеотида. Олигонуклеотидные цепи могут быть как немодифицированными, так и модифицированными в целях метаболической стабильности. Подобные модификации

40 включают, без ограничения, замещения в конкретных положениях по фосфатной группе (например, фосфоротиоат) и 2'-гидроксигруппе (например, 2'-О-метил и 2'-фтор).

В некоторых воплощениях R2 формулы I представляет собой $-X-S-CH_2-R_3$, где R3 включает смысловую цепь РНК, как показано ниже в формуле 5 (на основе формулы I):

45



где R1, n и X таковы, как определено в формуле I.

В других частных воплощениях смысловая цепь может быть связана с антисмысловой цепью.

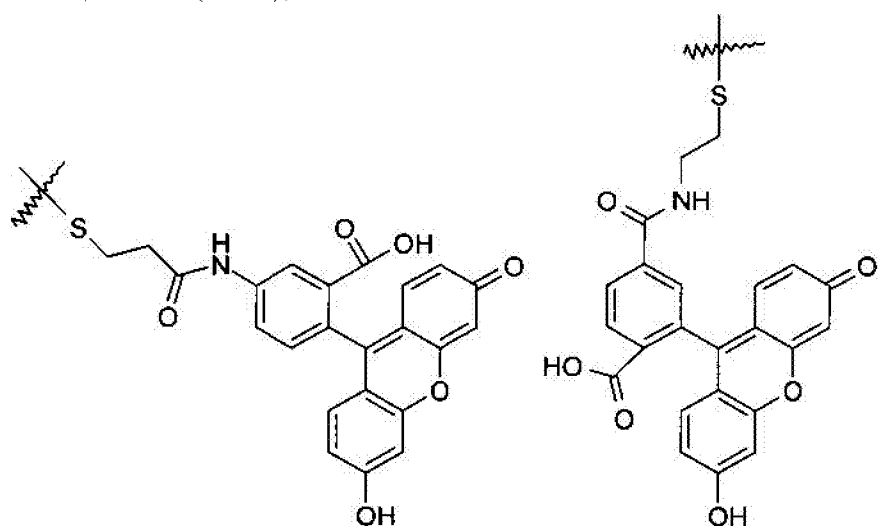
10 В других частных воплощениях R2 представляет собой -X-S-CH₂-R3, где R3 представляет собой низкомолекулярное соединение или белок, образуя таким образом ковалентно связанную, специфически нацеленную молекулу формулы I.

15 В более частных воплощениях R2 представляет собой -X-S-CH₂-R3, где R3 представляет собой терапевтическое низкомолекулярное соединение или белок.

В других частных воплощениях R2 представляет собой -X-S-CH₂-R3, где R3 представляет собой флуоресцирующий радикал, полезный в целях визуализации указанных связей интегринавого рецептора с применением технологий клеточной микроскопии.

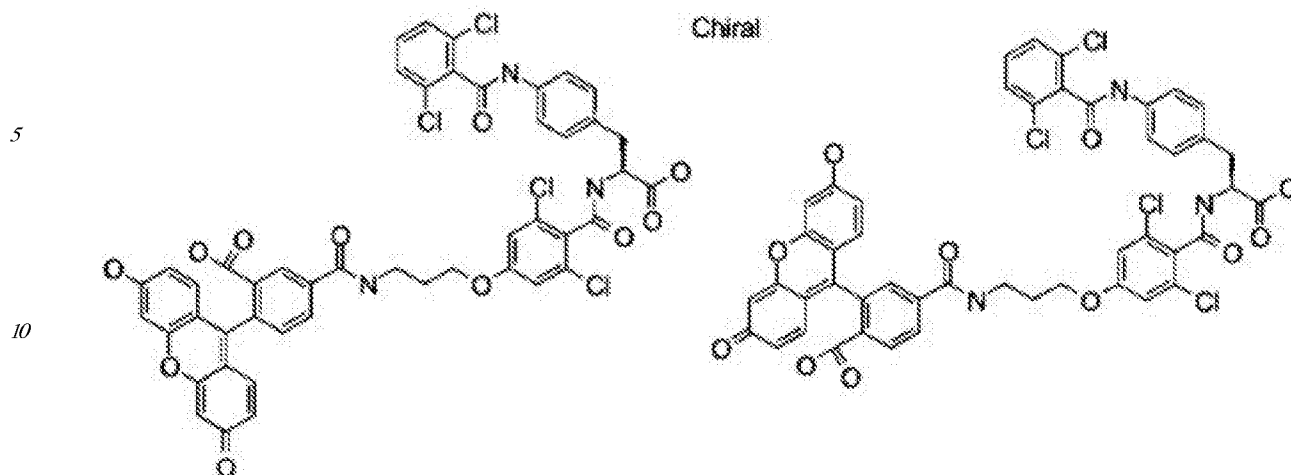
20 В других частных воплощениях R2 представляет собой -X-S-CH₂-R3, где R3 представляет собой полимер, содержащий первичные реакционноспособные сульфидные группы. Более конкретно, R3 может представлять собой катионный полимер, полезный для комплексования и доставки миРНК к поверхностям клеток и цитоплазматическим доменам клеток.

25 В более частных воплощениях настоящее изобретение относится к соединениям формулы I, где R3 представляет собой один из структурных изомеров флуоресцеин изотиоцианата (FITC), показанных ниже:



В других более конкретных воплощениях настоящее изобретение 20 относится к соединениям формулы I, где R3 представляет собой один из структурных изомеров FITC-14, показанный ниже:

45 хиральный



15 В других воплощениях настоящее изобретение относится к соединению формулы I, где n равно от 9 до 13, предпочтительно 12.

В частных воплощениях настоящее изобретение относится к соединению формулы I, выбранному из группы, состоящей из одного из следующих соединений (или его фармацевтически приемлемой соли или эфира):

20 VLA-4 Лиганд - Реагент 1

(S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-[[1-[2-[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино]этил]циклопентанкарбонил]амино]пропионовая кислота;

VLA-4 Лиганд - Реагент 2

25 (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-[[[1-[2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино]этил]циклопентил]карбонил]амино]-пропионовая кислота;

VLA-4 Лиганд - Реагент 3

30 (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-[[1-[2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]-этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино]-этил]циклопентанкарбонил]амино]пропионовая кислота;

VLA-4 Лиганд - Реагент 4

35 (S)-2-[[1-[2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-ацетилсульфанил-этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино]-этил]-циклопентанкарбонил]-амино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовая кислота;

VLA-4 Лиганд - Реагент 5

40 (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-[2,6-дихлор-4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]-пропиониламино]пропокси]бензоиламино]пропионовая кислота;

VLA-4 Лиганд - Реагент 6

45 (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-[2,6-дихлор-4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино]пропокси]-бензоиламино]пропионовая кислота;

VLA-4 Лиганд - Реагент 7

(S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-[2,6-дихлор-4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино]пропокси]-бензоиламино]пропионовая кислота;

[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]-этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]-этокси]пропиониламино]пропоксид]бензоиламино]пропионовая кислота;

VLA-4 Лиганд - Реагент 8

5 (S)-2-[[1-[4-[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]бутил]циклопентанкарбонил]-амино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]-пропионовая кислота;

VLA-4 Лиганд - Реагент 9

10 (S)-2-[2,6-дихлор-4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)-пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]пропоксид]-бензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовая кислота;

VLA-4 Лиганд - Реагент 10

15 (S)-2-[2,6-дихлор-4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]-этокси]пропиониламино]пропоксид]бензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовая кислота;

VLA-4 Лиганд - Реагент 11

20 (S)-2-[4-[[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]-пропионовая кислота, трифторацетатная соль;

VLA-4 Лиганд - Реагент 12

25 (S)-2-[4-[[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)-пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]-пропиониламино]метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовая кислота, трифторацетатная соль;

30 VLA-4 Лиганд - Реагент 13

(S)-2-[4-[[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-ацетилсульфанил-этокси]этокси]этокси]-этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]-пропионовая кислота; и

35 VLA-4 Лиганд - Реагент 14

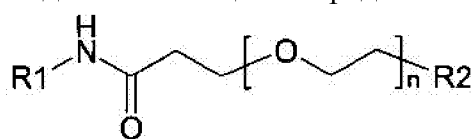
40 (S)-2-[4-[[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-ацетилсульфанилэтанокси)этокси]этокси]-этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]пропионил]-[4-[(S)-1-карбоксит-2-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]этилкарбамоил]-3,5-дифторбензиламино]метил]-2,6-дифторбензиламино]-3-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]пропионовая кислота.

Кроме того, настоящее изобретение относится к новым композициям и композициям, содержащим соединения формулы I, для создания наночастиц путем комбинирования с миРНК, с достижением улучшенной доставки нуклеиновых кислот, таких как миРНК, в цитоплазму клеток-мишеней, экспрессирующих комплексы $\alpha\beta 1$. В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к композиции миРНК, включающей: (1) соединение формулы I, в котором R2 включает 5'-миРНК олигонуклеотид; и (2) поликатионный агент для трансфекции.

Настоящее изобретение относится также к способам изготовления и применения

таких соединений и композиций. Соединения формулы I полезны как компоненты композиций или лекарственные формы, которые улучшают доставку лекарственных веществ, нуклеиновых кислот или других терапевтических соединений к тканям или клеткам, экспрессирующим комплексы $\alpha 4\beta 1$. В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к композициям, содержащим соединения формулы I, которые полезны для доставки миРНК в цитоплазму клеток-мишеней, экспрессирующих комплексы $\alpha 4\beta 1$, с целью ингибирования экспрессии конкретных белков за счет РНК-интерференции. В более частных воплощениях настоящее изобретение относится к соединениям формулы I и композициям, содержащим такие соединения, которые могут эффективно доставлять миРНК к опухолевым клеткам и клеткам других типов, экспрессирующим димеры $\alpha 4\beta 1$, для лечения раковых или воспалительных заболеваний. Такие соединения и композиции более эффективны и демонстрируют улучшенную выключающую способность, по сравнению с такими же композициями, не включающими соединения формулы I.

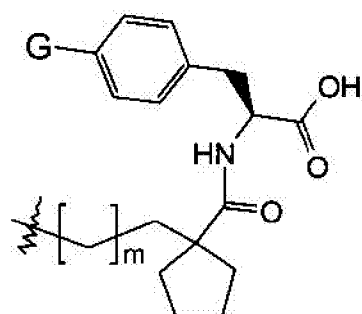
В одном воплощении предложено соединение формулы I:



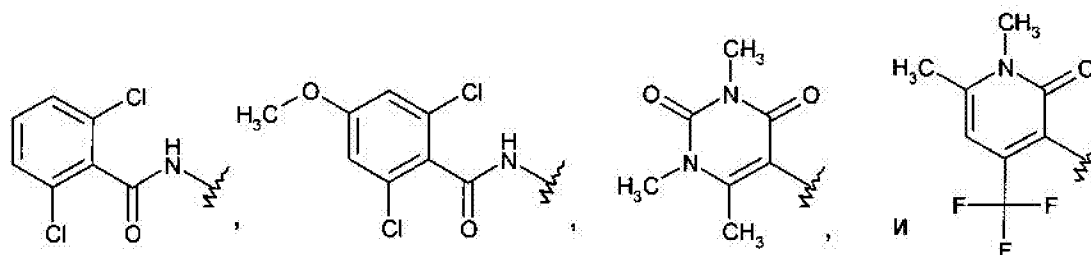
Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где: R1 выбран из группы, состоящей из:

(1) соединения формулы:

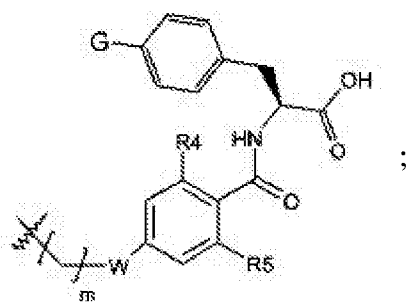


где m равно от 0 до 3, а G выбран из группы, состоящей из:



(2) соединения формулы:

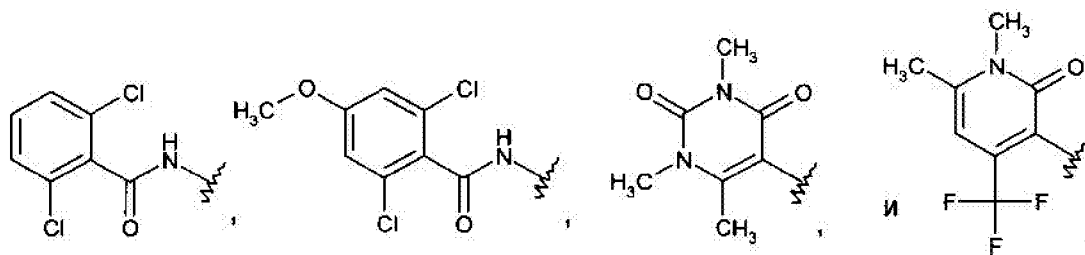
5



10

где m равно от 0 до 3, R_4 и R_5 представляют собой независимо водород или галоген, W представляет собой O или CH_2 , а G выбран из группы, состоящей из:

15

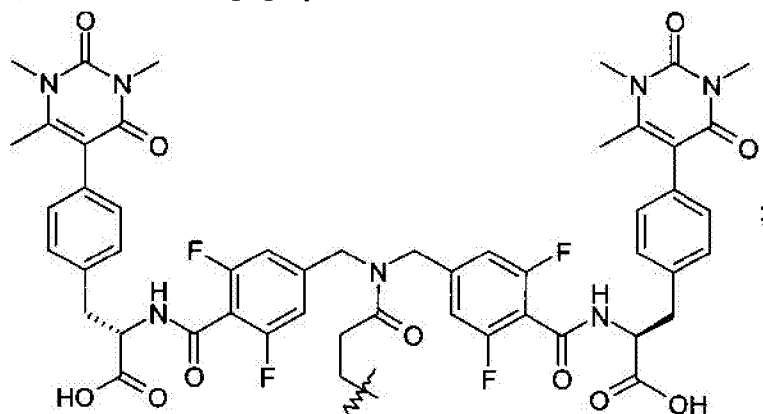


и

20

(3) соединения формулы:

25

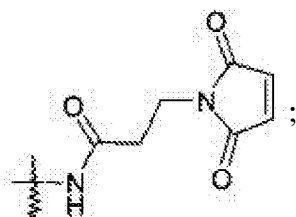


30

R_2 выбран из группы, состоящей из:

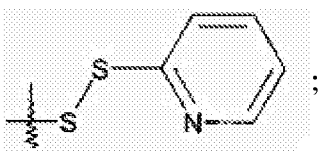
(1) соединения формулы:

35



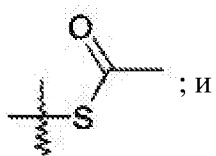
40

(2) соединения формулы:



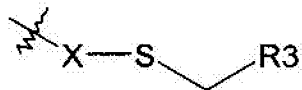
45

(3) соединения формулы:



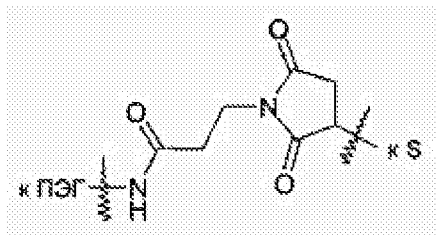
5

(4) соединения формулы:



10

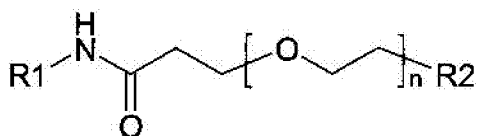
где R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой либо серу, либо соединение формулы:



15

В одном воплощении предложено соединение формулы I:

20

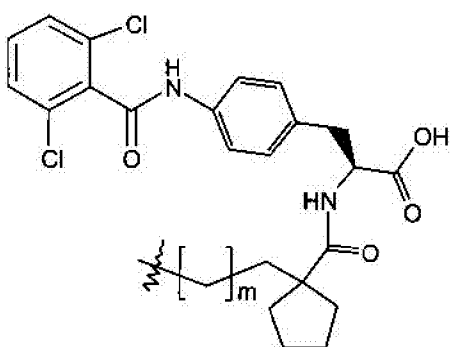


Формула I

25

или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где: R1 представляет собой

30



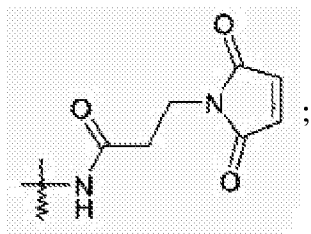
35

где m равно от 0 до 3.

R2 выбран из группы, состоящей из:

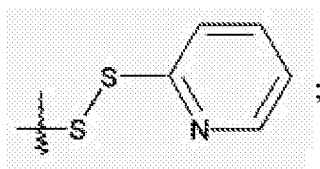
(1) соединения формулы:

40



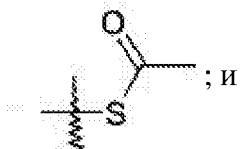
45

(2) соединения формулы:



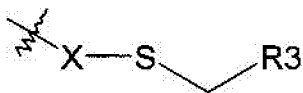
5

(3) соединения формулы:



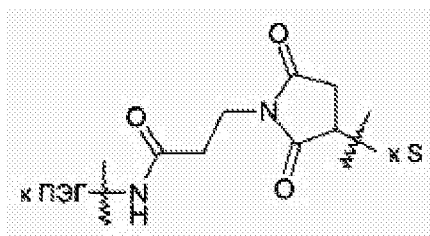
10

(4) соединения формулы:



15

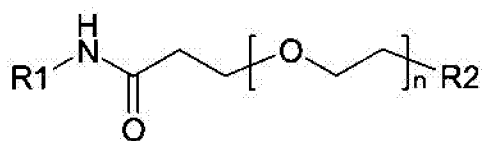
где R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой либо серу, либо соединение формулы:



20

В одном воплощении предложено соединение формулы I:

25

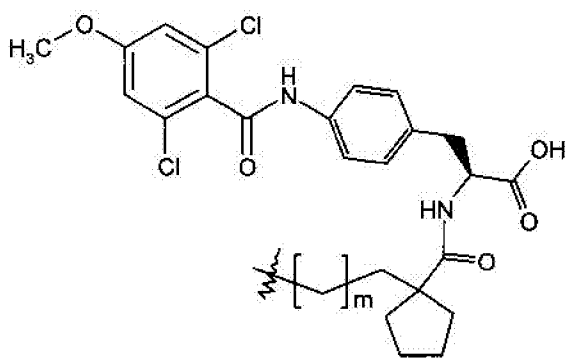


30

Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где: R1 представляет собой соединение формулы:

35



40

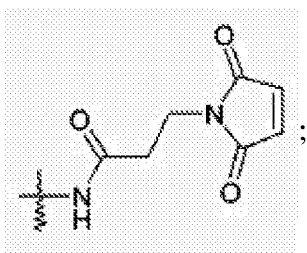
где m равно от 0 до 3;

R2 выбран из группы, состоящей из:

45

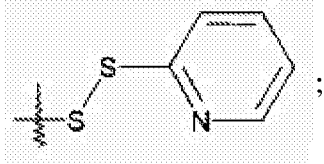
(1) соединения формулы:

5



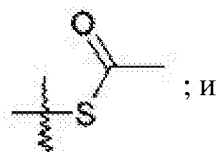
(2) соединения формулы:

10



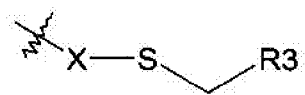
(3) соединения формулы:

15



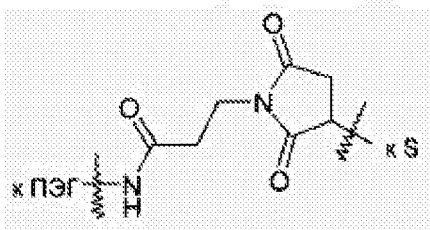
(4) соединения формулы:

20



где R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой либо серу, либо соединение формулы:

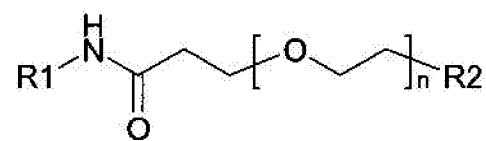
25



30

В одном воплощении предложено соединение формулы I:

35

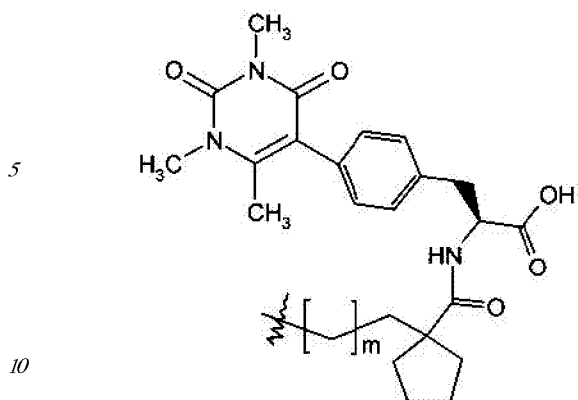


Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где: R1 представляет собой соединение формулы:

40

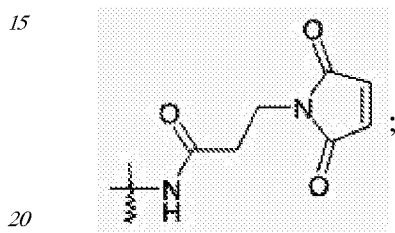
45



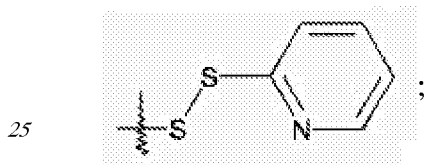
где m равно от 0 до 3.

R2 выбран из группы, состоящей из:

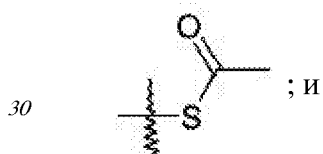
(1) соединения формулы:



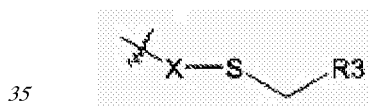
(2) соединения формулы:



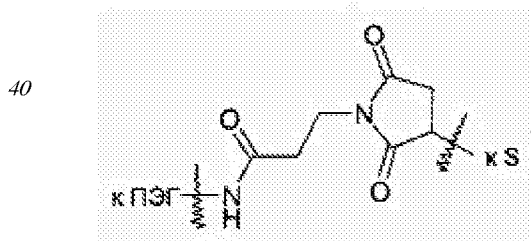
(3) соединения формулы:



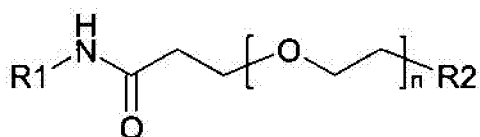
(4) соединения формулы:



где R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой либо серу, либо соединение формулы:



В одном воплощении предложено соединение формулы I:

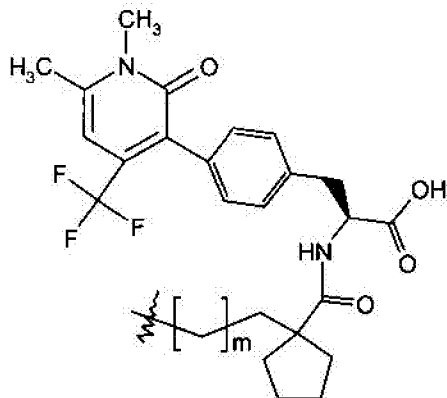


5

Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где: R1 представляет собой соединение формулы:

10



15

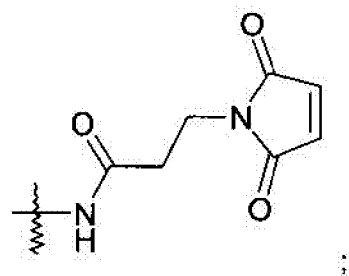
20

где m равно от 0 до 3.

R2 выбран из группы, состоящей из:

(1) соединения формулы:

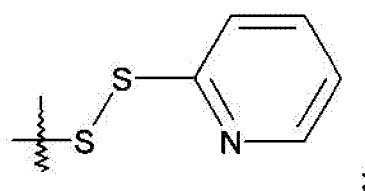
25



30

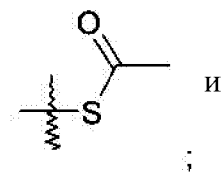
(2) соединения формулы:

35



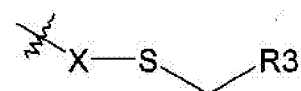
(3) соединения формулы:

40



(4) соединения формулы:

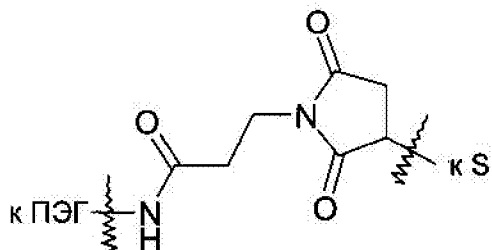
45



где R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой

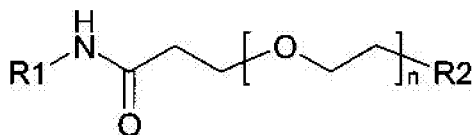
либо серу, либо соединение формулы:

5



10

В одном воплощении предложено соединение формулы I:

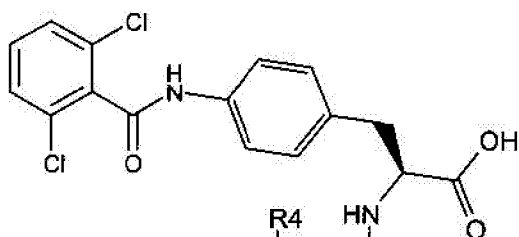


15

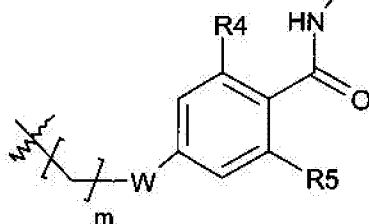
Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где: R1 представляет собой соединение формулы:

20



25



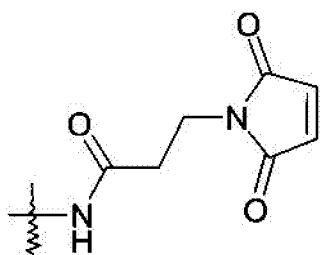
30

где m равно от 0 до 3, R4 и R5 представляют собой водород или галоген, а W представляет собой O или CH₂.

R2 выбран из группы, состоящей из:

(1) соединения формулы:

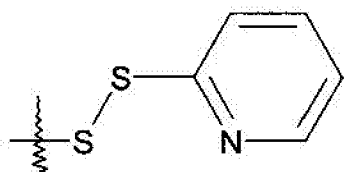
35



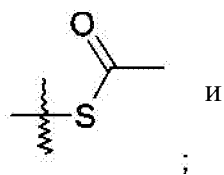
40

(2) соединения формулы:

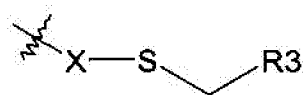
45



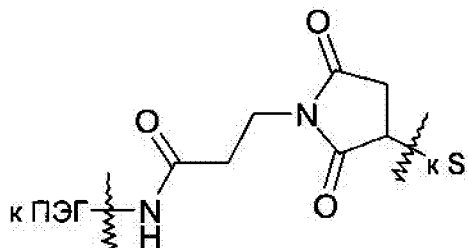
(3) соединения формулы:



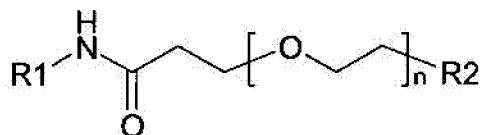
(4) соединения формулы:



где R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой либо серу, либо соединение формулы:

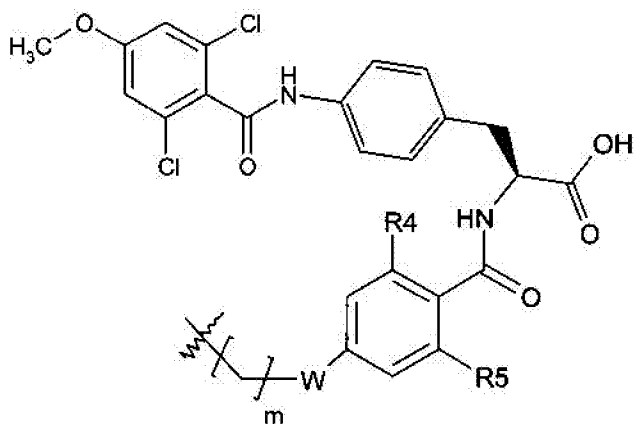


В одном воплощении предложено соединение формулы I:



25 **Формула I**

или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где: R1 представляет собой соединение формулы:



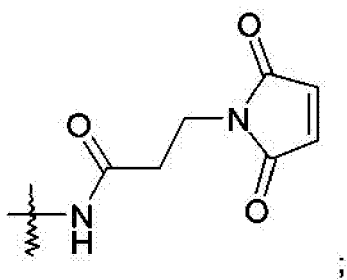
40 где m равно от 0 до 3, R4 и R5 представляют собой водород или галоген, а W представляет собой O или CH₂.

R2 выбран из группы, состоящей из:

(1) соединения формулы:

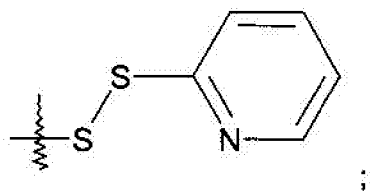
45

5



(2) соединения формулы:

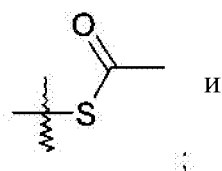
10



15

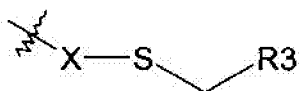
(3) соединения формулы:

20



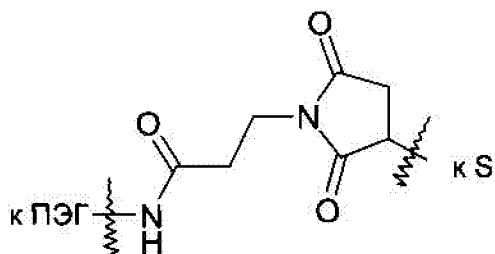
(4) соединения формулы:

25



где R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой либо серу, либо соединение формулы:

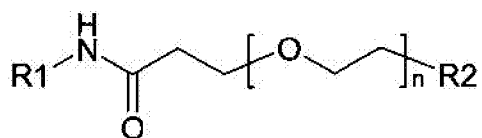
30



35

В одном воплощении предложено соединение формулы I:

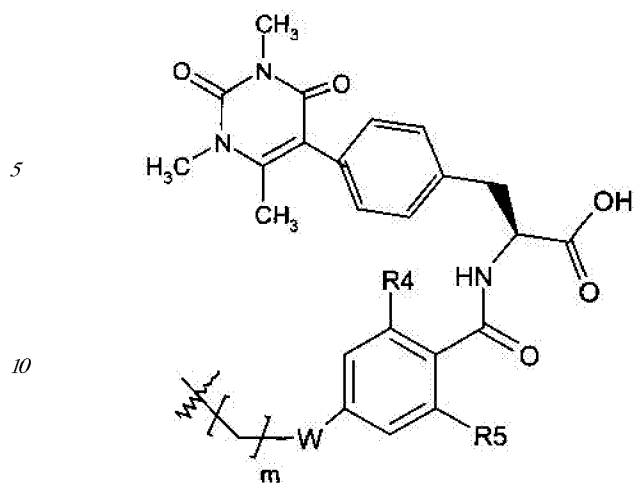
40



Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где: R1 представляет собой соединение формулы:

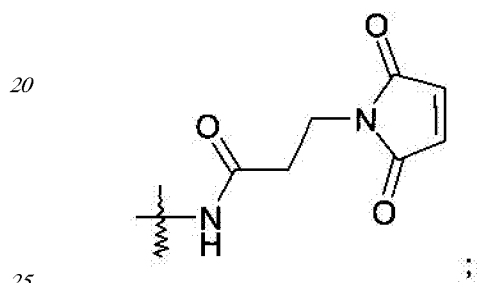
45



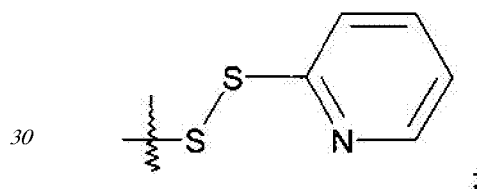
где m равно от 0 до 3, R_4 и R_5 представляют собой водород или галоген, а W
 15 представляет собой O или CH_2 .

R_2 выбран из группы, состоящей из:

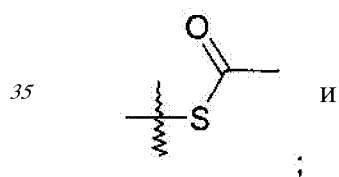
(1) соединения формулы:



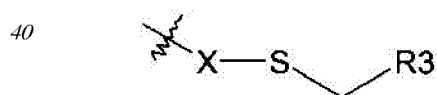
(2) соединения формулы:



(3) соединения формулы:



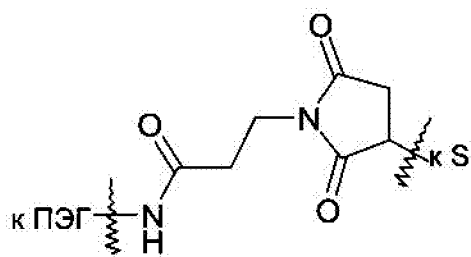
(4) соединения формулы:



где R_3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой
 либо серу, либо соединение формулы:

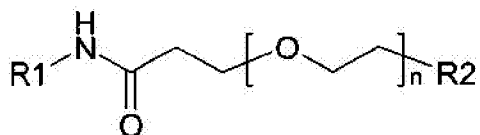
45

5



В одном воплощении предложено соединение формулы I:

10

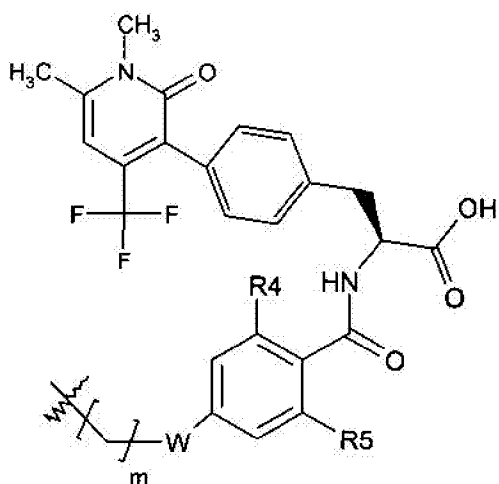


Формула I

15

или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где: R1 представляет собой соединение формулы:

20



25

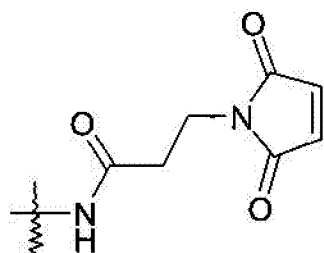
30

где m равно от 0 до 3, R4 и R5 представляют собой водород или галоген, а W представляет собой O или CH₂.

R2 выбран из группы, состоящей из:

(1) соединения формулы:

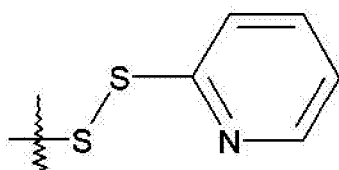
35



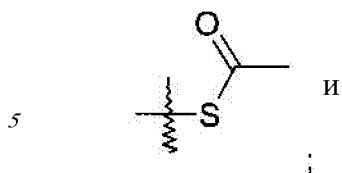
40

(2) соединения формулы:

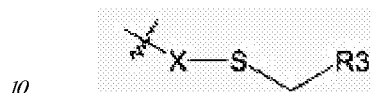
45



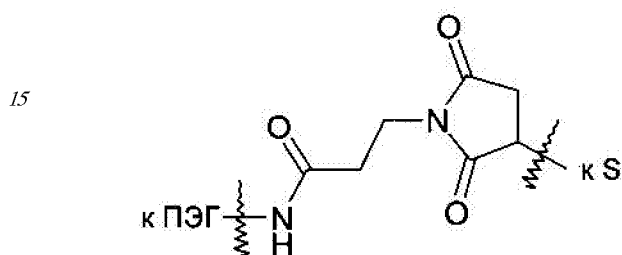
(3) соединения формулы:



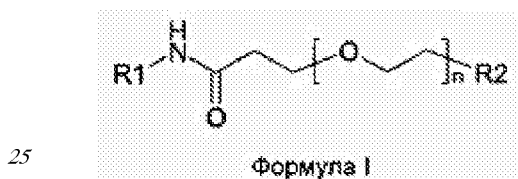
(4) соединения формулы:



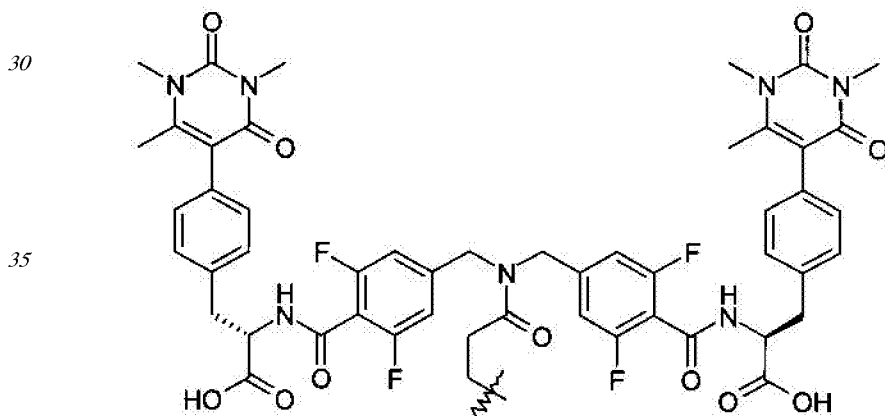
где R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой либо серу, либо соединение формулы:



В одном воплощении предложено соединение формулы I:



или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где: R1 представляет собой соединение формулы:

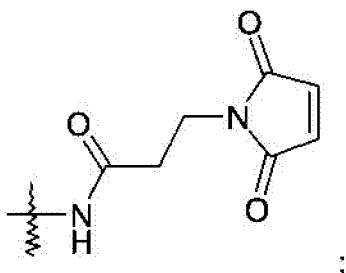


R2 выбран из группы, состоящей из:

(1) соединения формулы:

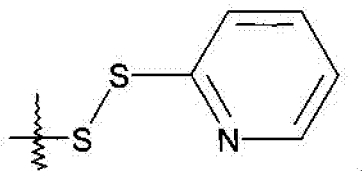
45

5



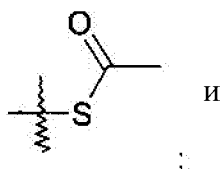
(2) соединения формулы:

10



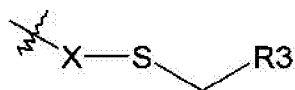
(3) соединения формулы:

15



20

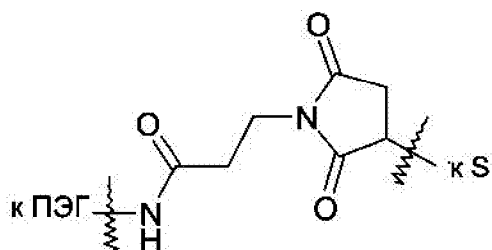
(4) соединения формулы:



25

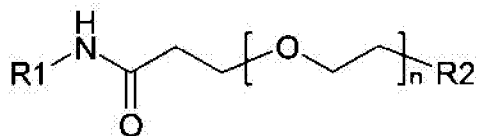
где R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой либо серу, либо соединение формулы:

30



35

В одном воплощении предложено соединение формулы I:



40

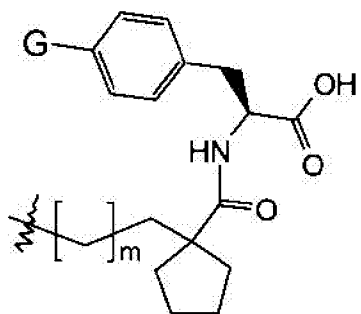
Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где: R1 выбран из группы, состоящей из:

(1) соединения формулы:

45

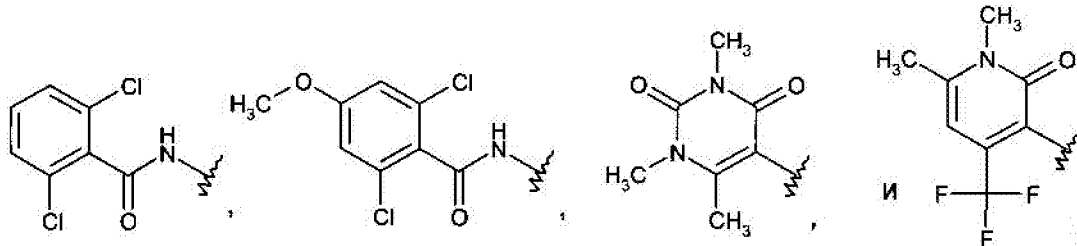
5



10

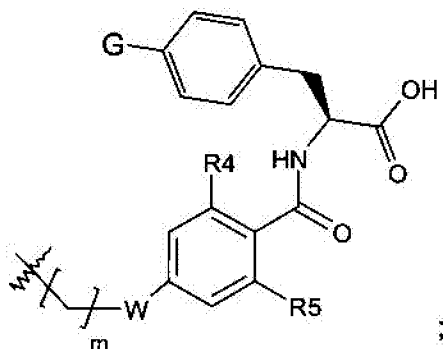
где m равно от 0 до 3, а G выбран из группы, состоящей из:

15



(2) соединения формулы:

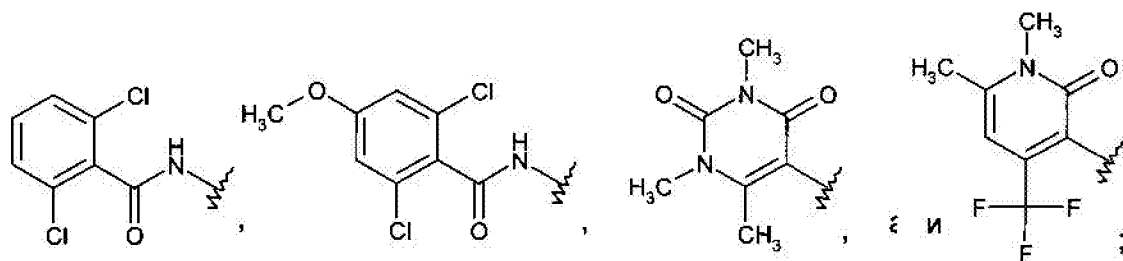
20



25

где m равно от 0 до 3, R4 и R5 представляют собой независимо водород или галоген, W представляет собой O или CH₂, а G выбран из группы, состоящей из:

30

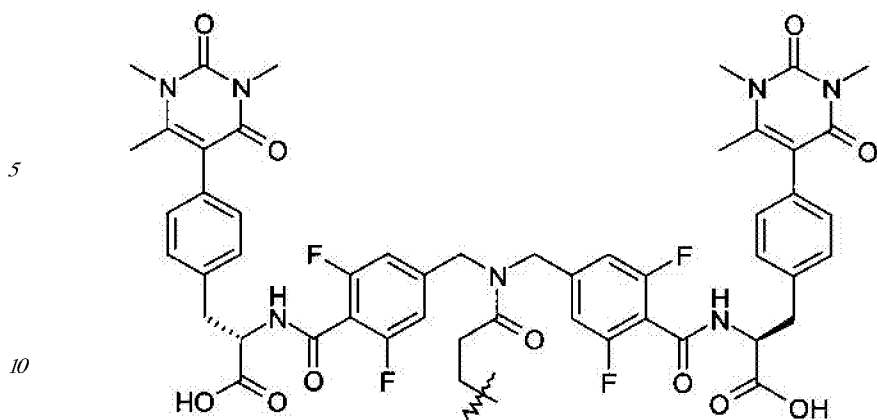


35

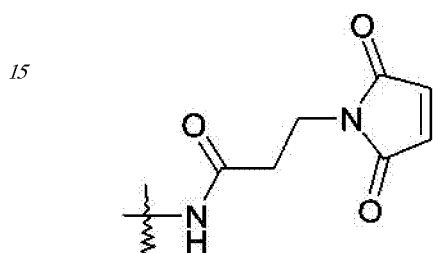
и
(3) соединения формулы:

40

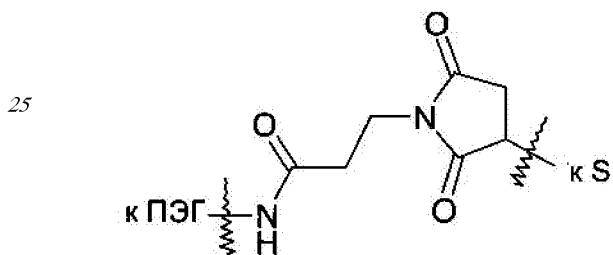
45



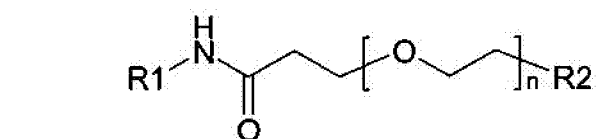
R2 представляет собой соединение формулы:



где R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой либо серу, либо соединение формулы:



В одном воплощении предложено соединение формулы I:

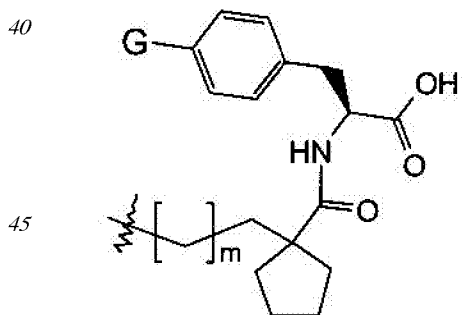


Формула I

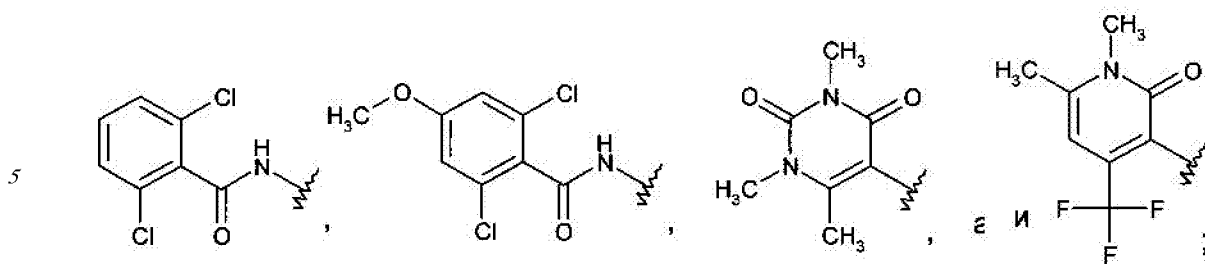
или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где:

R1 выбран из группы, состоящей из:

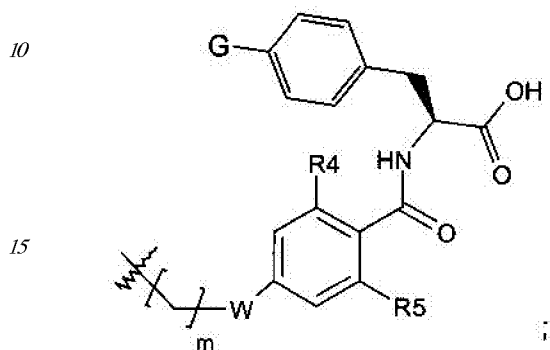
(1) соединения формулы:



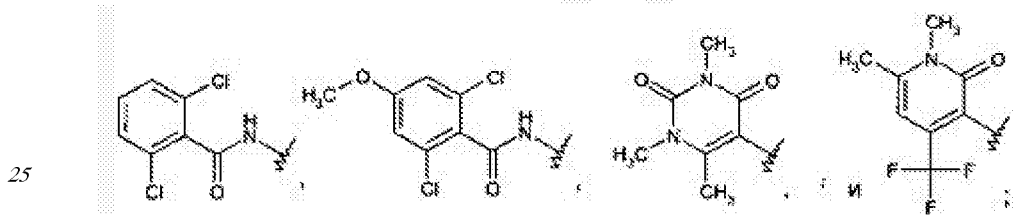
где m равно от 0 до 3, а G выбран из группы, состоящей из:



(2) соединения формулы:

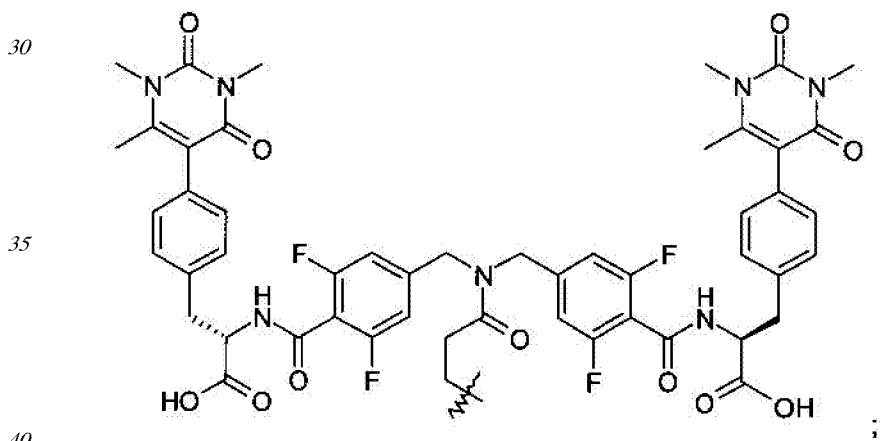


где m равно от 0 до 3, R4 и R5 представляют собой независимо водород или галоген, W представляет собой O или CH₂, а G выбран из группы, состоящей из:

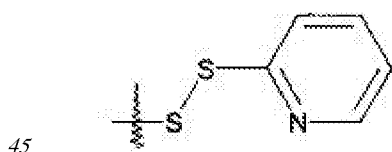


и

(3) соединения формулы:

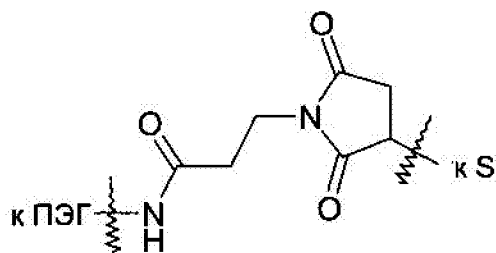


R2 представляет собой соединение формулы:



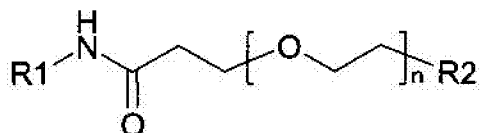
где R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой либо серу, либо соединение формулы:

5



В одном воплощении предложено соединение формулы I:

10



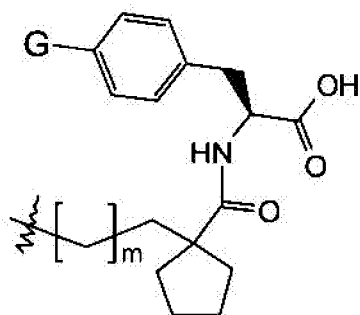
Формула I

15

или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где: R1 выбран из группы, состоящей из:

(1) соединения формулы:

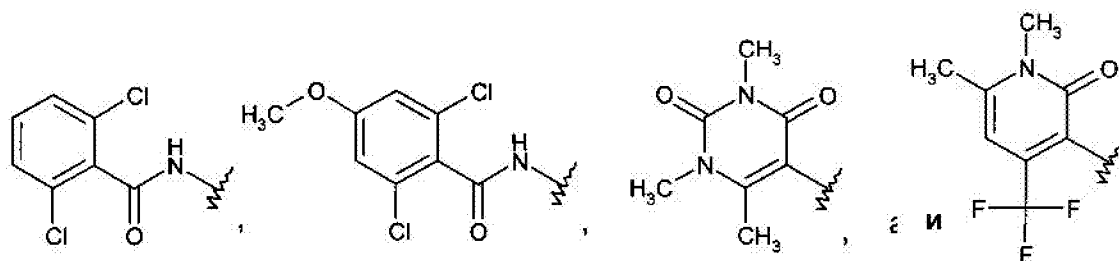
20



25

где m равно от 0 до 3, а G выбран из группы, состоящей из:

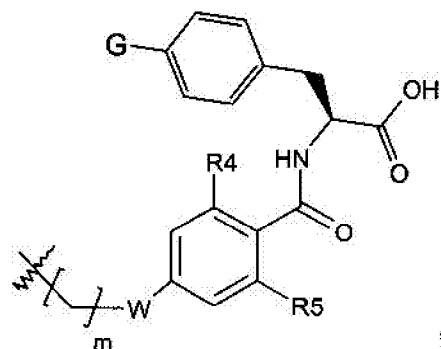
30



35

(2) соединения формулы:

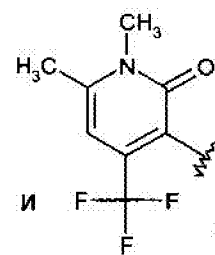
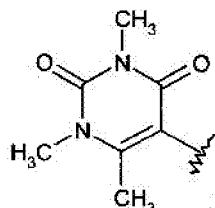
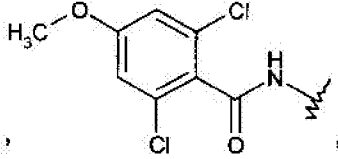
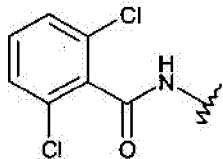
40



45

где m равно от 0 до 3, R4 и R5 представляют собой независимо водород или галоген, W представляет собой O или CH₂, а G выбран из группы, состоящей из:

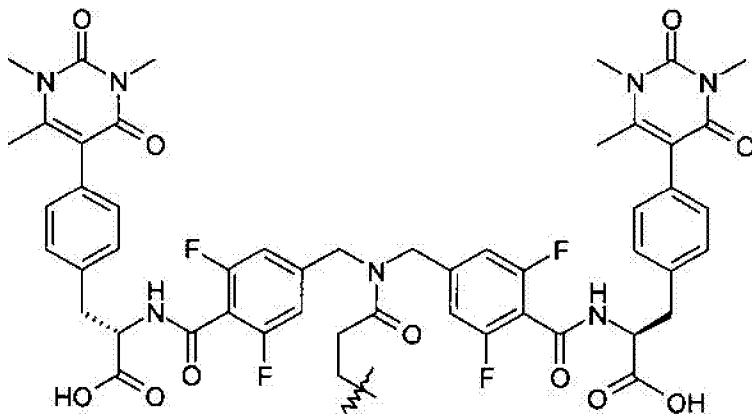
5



и

(3) соединения формулы:

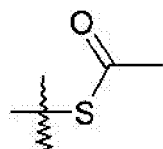
10



15

20

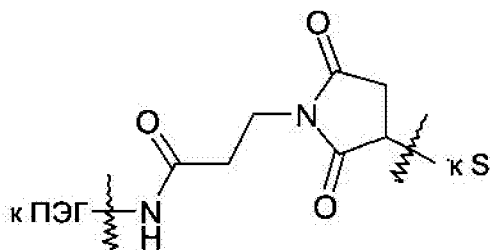
R2 представляет собой соединение формулы:



25

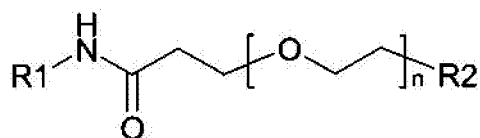
где R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, а X представляет собой либо серу, либо соединение формулы:

30



35

В одном воплощении предложено соединение формулы I:



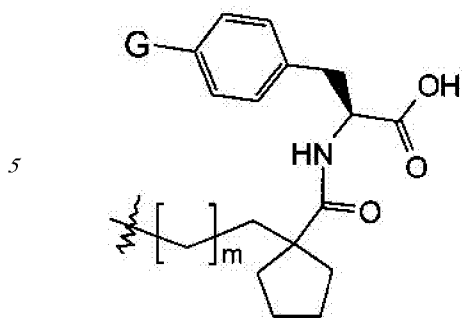
40

Формула I

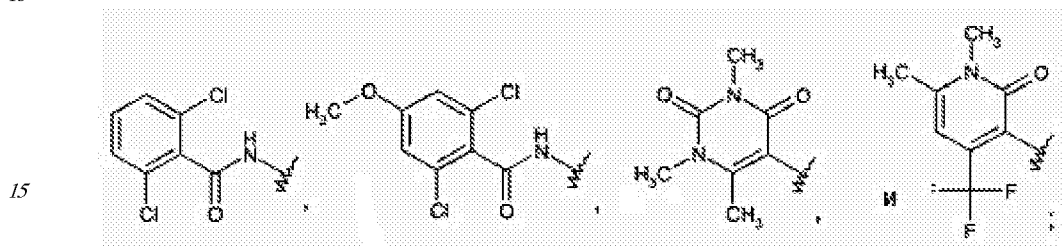
или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где: R1 выбран из группы, состоящей из:

(1) соединения формулы:

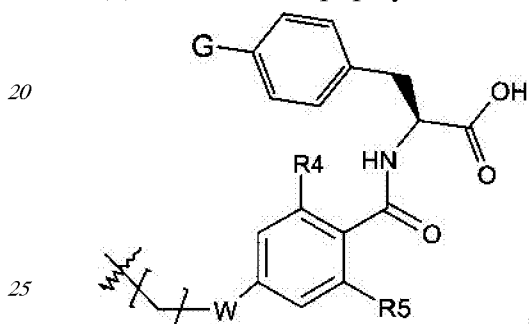
45



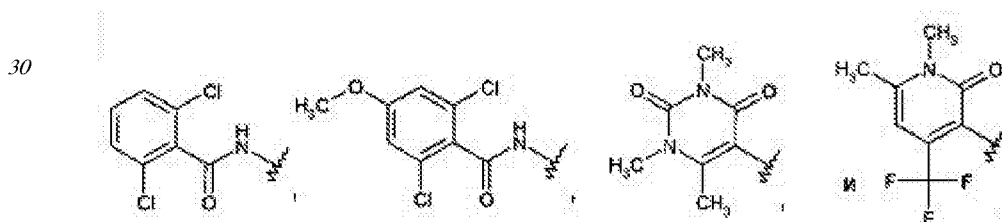
10 где m равно от 0 до 3, а G выбран из группы, состоящей из:



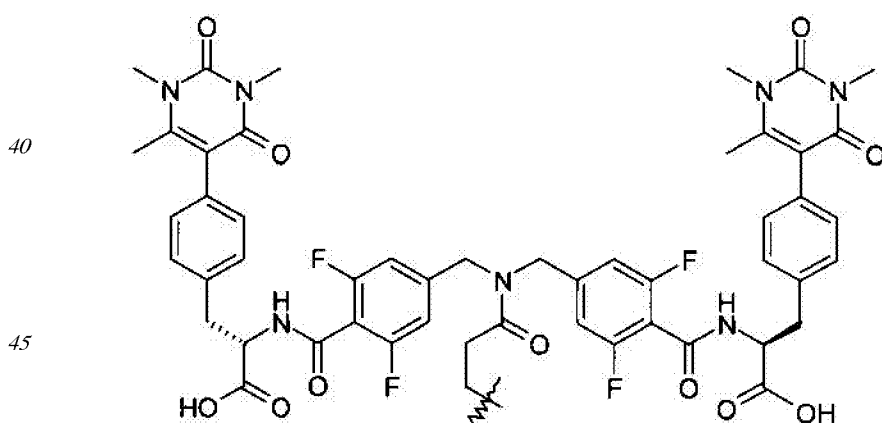
(2) соединения формулы:



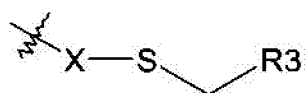
25 где m равно от 0 до 3, R4 и R5 представляют собой независимо водород или галоген, W представляет собой O или CH₂, а G выбран из группы, состоящей из:



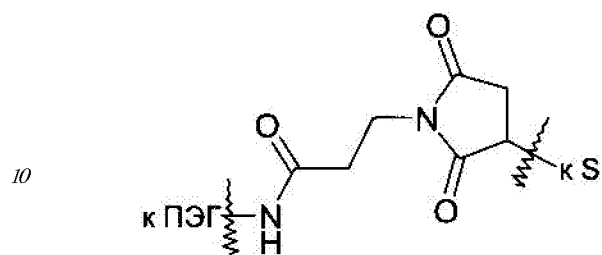
35 и
(3) соединения формулы:



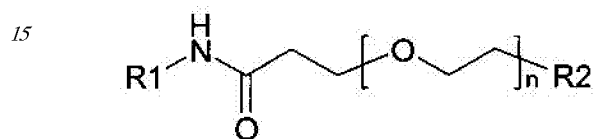
45 R2 представляет собой соединение формулы:



где R3 представляет собой олигонуклеотид с одинарной или двойной цепью, а X представляет собой либо серу, либо соединение формулы:



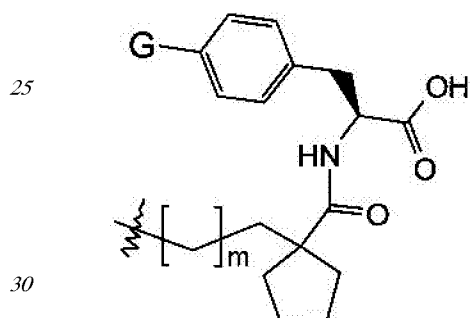
В одном воплощении предложено соединение формулы I:



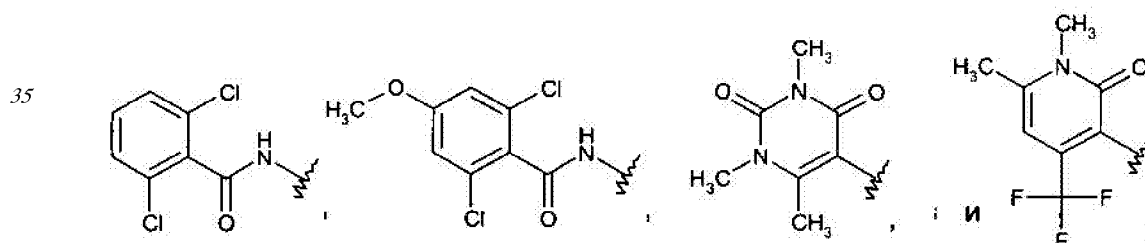
Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; где n равно от 1 до 24 и где: R1 выбран из группы, состоящей из:

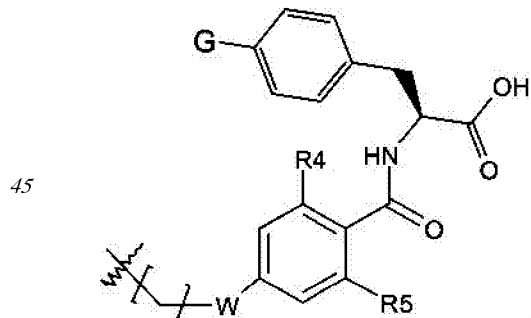
(1) соединения формулы:



где m равно от 0 до 3, а G выбран из группы, состоящей из:

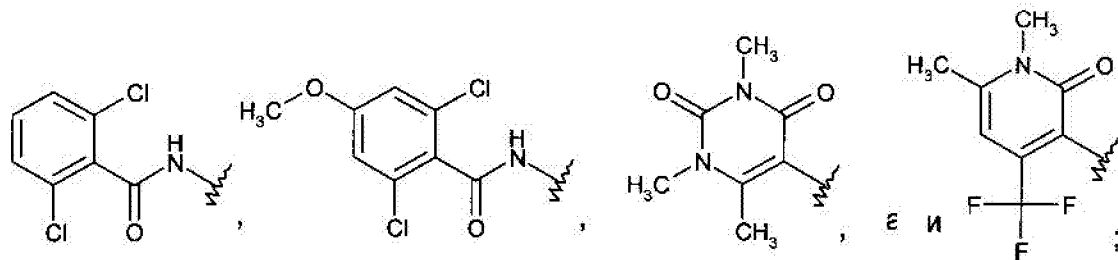


(2) соединения формулы:



где m равно от 0 до 3, R4 и R5 представляют собой независимо водород или галоген, W представляет собой O или CH₂, а G выбран из группы, состоящей из:

5



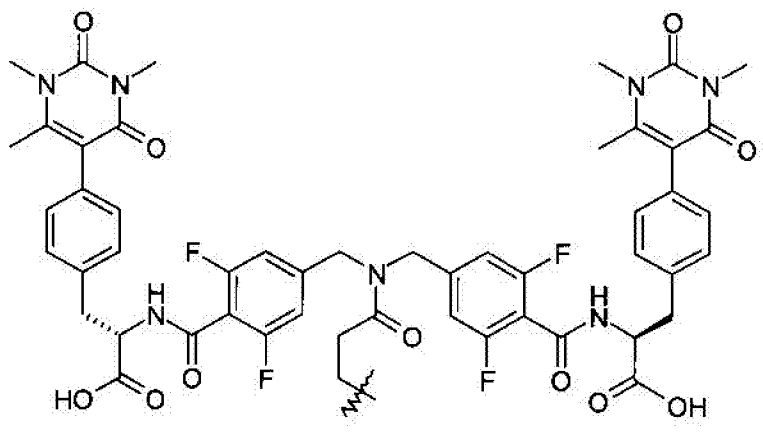
10

и

(3) соединения формулы:

15

20

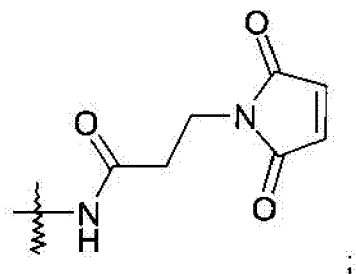


25

R2 выбран из группы, состоящей из:

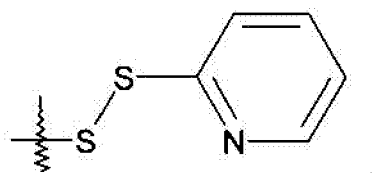
(1) соединения формулы:

30



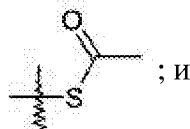
(2) соединения формулы:

35



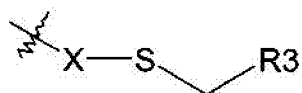
40

(3) соединения формулы:



45

(4) соединения формулы:



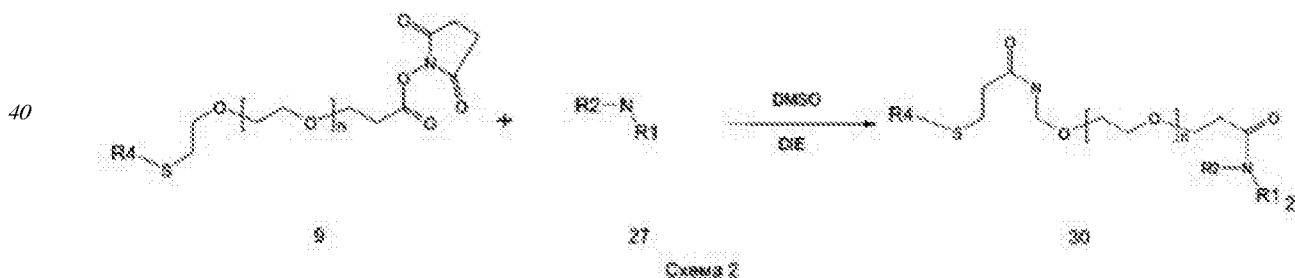
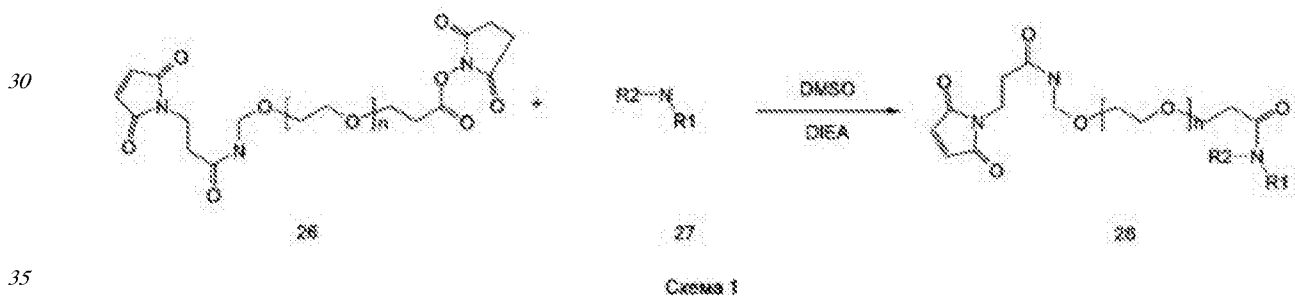
где R3 представляет собой молекулу миРНК.

ОБЩИЙ СПОСОБ СИНТЕЗА СОЕДИНЕНИЙ ПО НАСТОЯЩЕМУ ИЗОБРЕТЕНИЮ

Подходящие способы для синтеза соединений формулы I представлены в примерах. В целом, соединения формулы I можно получить в соответствии со схемами, приведенными ниже. Если не указано иное, переменные n, R1 и R2 в ниже следующих схемах имеют такое же определение, как и в представленной ранее родовой формулы I.

Общий синтез конъюгирующих агентов малеимид-(ПЭГ)п-антагонистов интегрина
Соединения структуры 26 на схеме 1 с различной длиной ПЭГ имеются в продаже (например, в Pierce BioScience). Такие соединения можно также получать ацилированием амино-концов ПЭГ-аминокислот с помощью 3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)-пропионовой кислоты в условиях для образования амидной связи, с последующим образованием реакционноспособных N-гидроксисукциновых эфиров в ходе реакции N-гидроксиянтарной кислоты в условиях для образования эфира. Как показано на схеме 1, введение в реакцию соединений 26 с соединениями, содержащими первичную или вторичную аминогруппу, такими как соединения 27, проводят в апротонных или протонных растворителях в присутствии основных аминов, таких как DIEA (диизопропилэтиламин), при комнатной температуре, с образованием ПЭГ-илированных промежуточных продуктов 28.

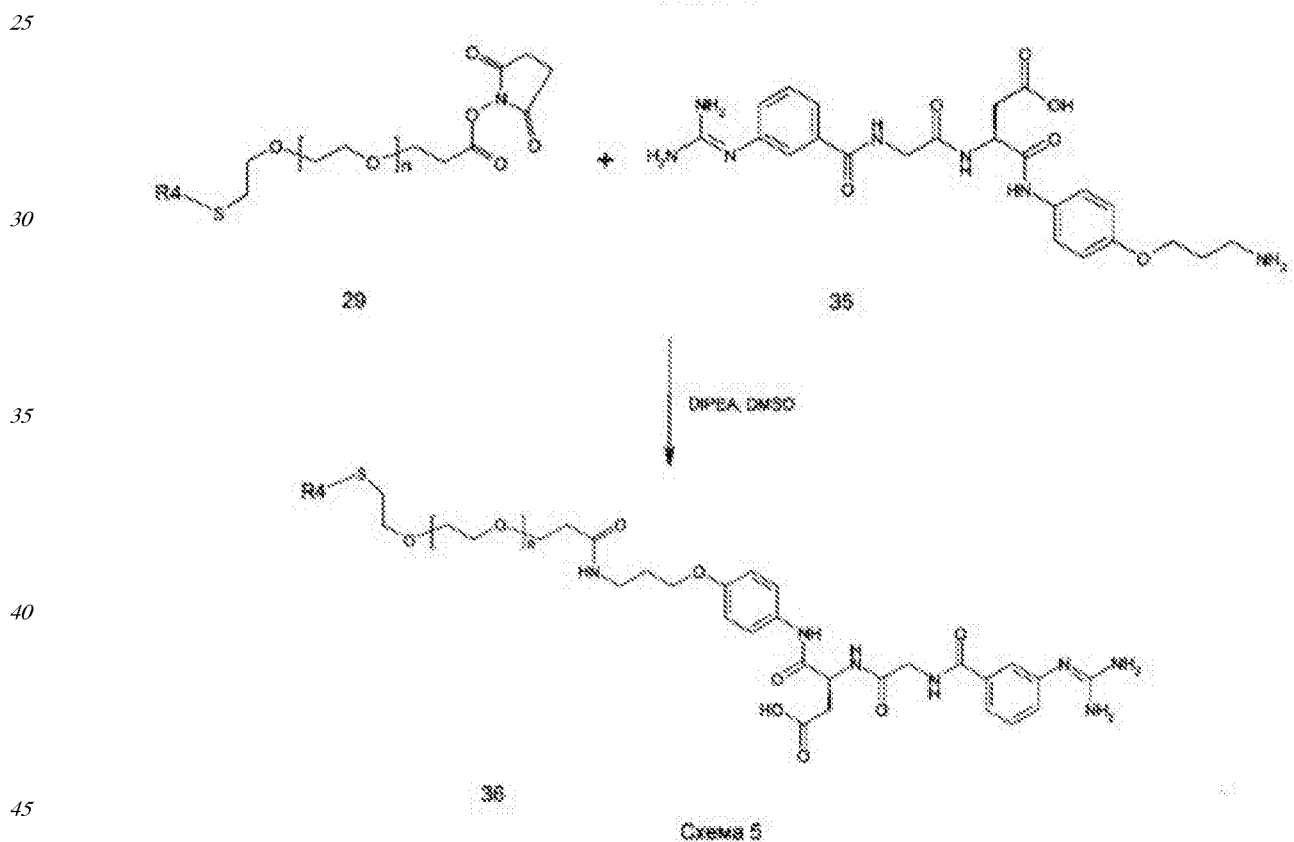
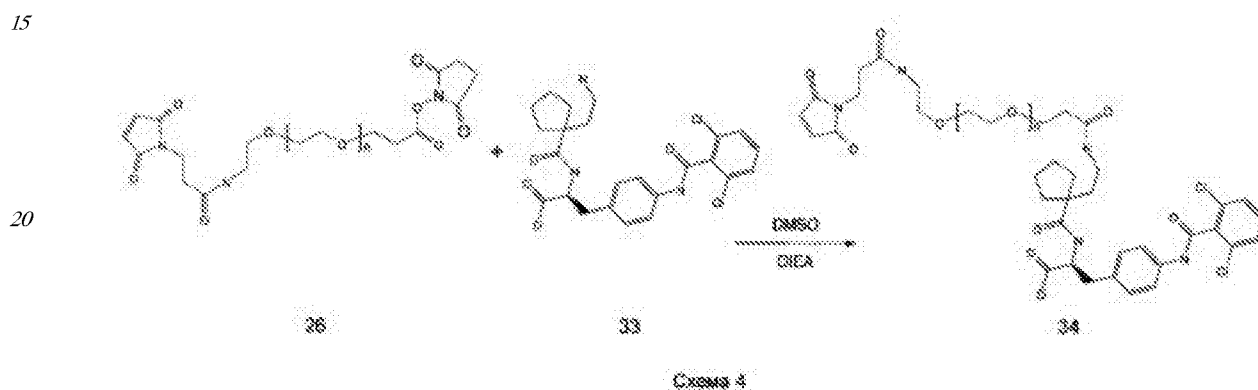
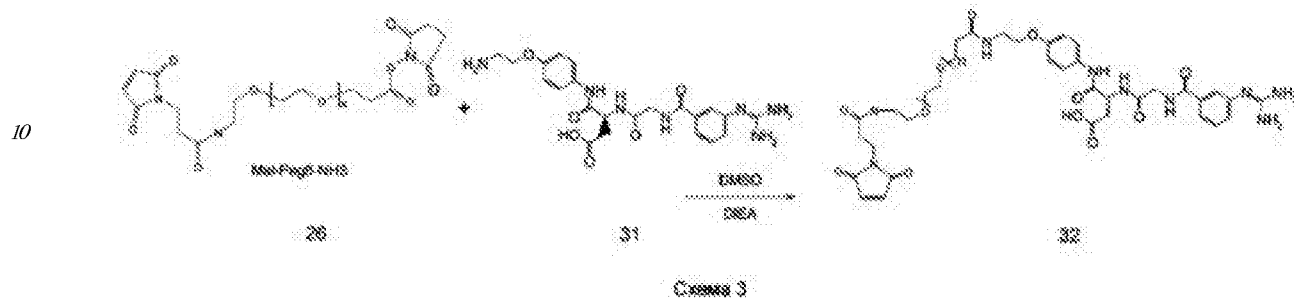
Соединения структуры 29 на схеме 2, в которых R4 представляет собой тиацетил или 2-дитиопиридил, содержащие ПЭГ-группы различной длины, также имеются в продаже (например, в Pierce Bioscience). Реакцию соединений структуры 29 с соединениями, содержащими первичные или вторичные аминогруппы, такими как соединения 27, проводят в апротонных или протонных растворителях в присутствии основных аминов, таких как DIEA (диизопропилэтиламин), при комнатной температуре, с получением ПЭГ-илированных промежуточных продуктов 30.



В качестве частного, не налагающего ограничений примера настоящего изобретения, промежуточное соединение 26 вводят в реакцию с соединением 31 с получением промежуточного малеимида 32, как показано на схеме 3.

Аналогичным образом, промежуточное соединение 26 можно вводить в реакцию с соединением 33 с получением промежуточного малеимида 34, как показано на схеме 4.

Аналогичным образом, промежуточное соединение 29 можно вводить в реакцию с соединением 35 с получением промежуточного соединения 36, как показано на схеме 5, на которой R4 представляет собой либо тиацетил, либо 2-дителиопиридил.

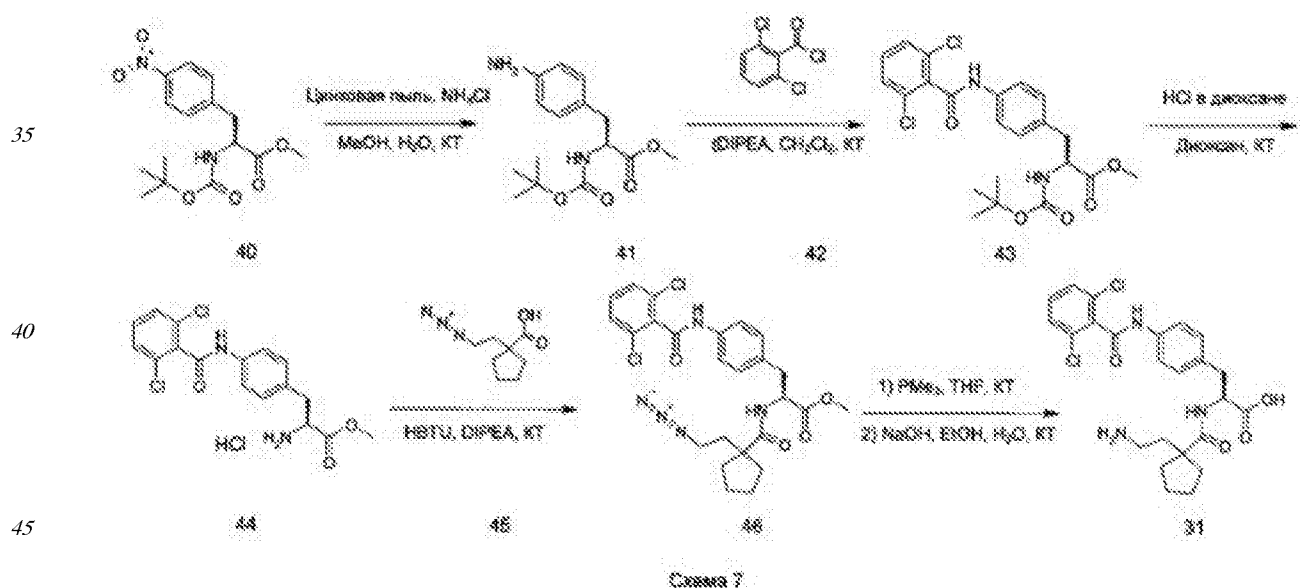
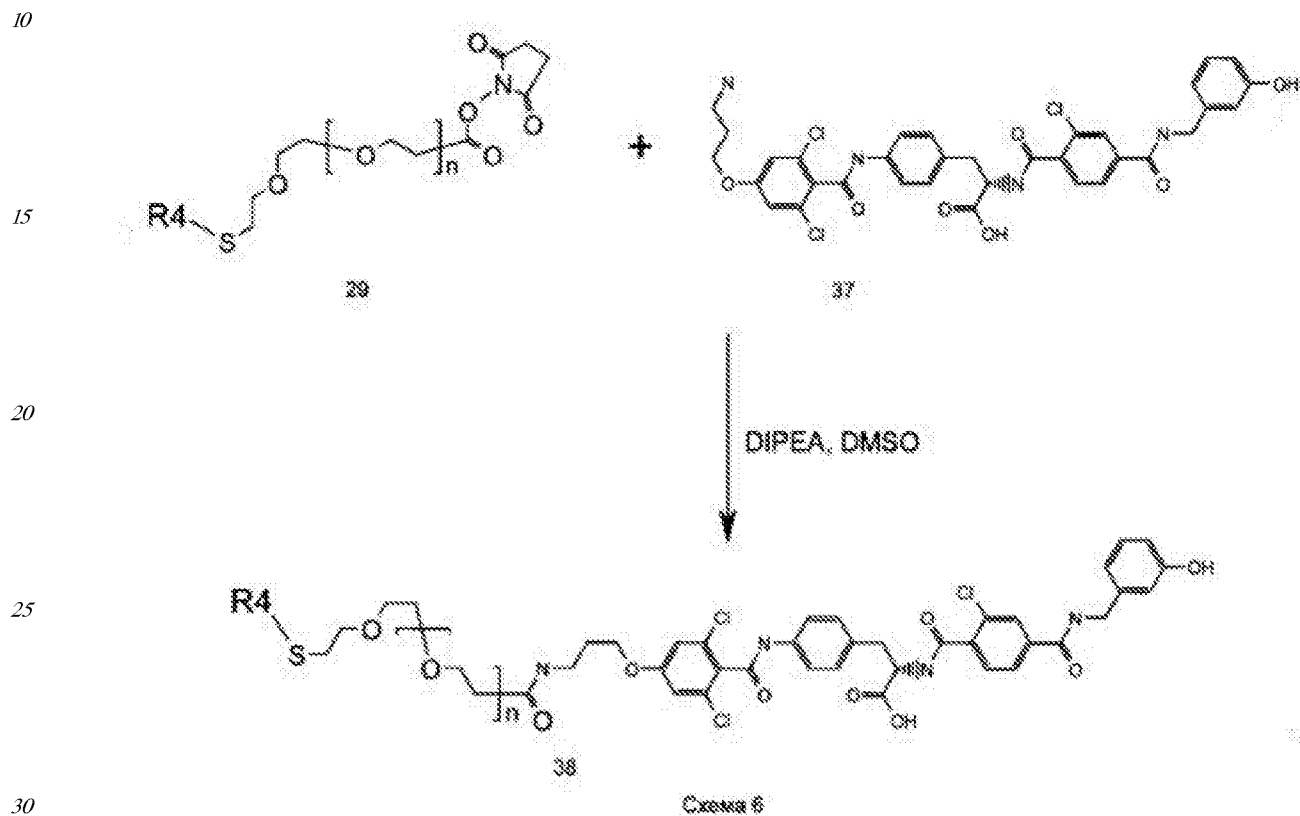


Аналогичным образом, промежуточное соединение 29 можно вводить в реакцию с соединением 37 с получением промежуточного соединения 38, как показано на схеме

6, где R4 представляет собой либо тиацетил, либо 2-дителипиридил.

Для соединений общей структуры 26 или 29, коммерчески доступны ПЭГ различной длины, или их легко может получить специалист в данной области техники; предпочтительно n=8-24. По данной теме имеется много статей и обзоров (например: Chemistry for peptide и protein PEGylation, Advanced Drug Delivery Reviews Volume 54, Issue 4, 17 June 2002, Pages 459-476).

Промежуточное соединение 31 можно синтезировать таким же способом, как уже сообщалось в литературе (например, Sidduri, A. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2002,12, 2475-2478), как показано на схеме 7.



В частности, как показано на схеме 7, промежуточное соединение 41 получали из

имеющейся в продаже (S)-3-[4-нитрофенил]-2-трет-бутоксикарбонил-аминопропионовой кислоты 40. Нитрогруппу имеющегося в продаже исходного вещества 40 в метанольном растворе восстанавливали цинковой пылью в присутствии хлорида аммония при комнатной температуре в течение нескольких часов с получением анилина 41. Другие
5 способы для восстановления нитрогруппы известны специалистам в данной области техники. Анилин 41 ацилировали производными бензоилгалида, такими как 2,6-дихлорбензоилхлорид 42, в апротонном растворителе, таком как дихлорметан, в присутствии основания, такого как диизопропилэтиламин, при комнатной температуре. Таким образом получали амид 43. Трет-бутилкарбонильную (Boc) аминопротекторную
10 группу удаляли стандартными способами, известными специалистам в данной области техники, например путем обработки раствором HCl в диоксане при комнатной температуре; в результате этого получали гидрохлорид 44. Гидрохлорид 44 обрабатывали в условиях образования амидной связи (также хорошо известных
15 специалистам в данной области техники) в присутствии хорошо известной 1-(2-азидоэтил)-циклопентанкарбоновой кислоты 45 с получением диамида 46. Азидную группу в промежуточном соединении 46 восстанавливали путем обработки триалкилфосфином в апротонном растворителе, таком как тетрагидрофуран, при комнатной температуре. Затем полученный метиловый эфир омыляли путем обработки гидроксидом натрия в смеси растворителей, таких как этанол и тетрагидрофуран, при повышенной
20 температуре, например при 50°C, в течение 15 ч. В результате этого получали промежуточное соединение 31, которое может также существовать в виде цвиттер-иона.

Присоединение ПЭГ-фрагмента возможно также с помощью промежуточного соединения 39, которое синтезируют, как показано на схеме 8. В частности, 3,5-дихлорфенол 47 защищают с помощью три-изопропил-силилхлорида в присутствии
25 основания, такого как имидазол, в полярном апротонном растворителе, таком как DMF, после чего проводят реакцию с сильным основанием, таким как бутиллитий, в безводном тетрагидрофуране при низкой температуре, например при -78°C. Получаемый комплекс лития гасят диоксидом углерода, который добавляют в форме сухого льда, с получением промежуточного соединения 48, производного бензойной кислоты.
30 Промежуточное соединение 48 затем хлорируют с образованием ацилхлорида, путем обработки сульфонилхлоридом (SOCl₂) в апротонном растворителе, таком как толуол. Полученный ацилхлорид далее вводят в реакцию с гидрохлоридом амина 49 в присутствии основания, такого как диизопропилэтиламин (DIPEA), в апротонном
35 растворителе, таком как дихлорметан (DCM), получая при этом промежуточное соединение 50. Силильную защитную группу в промежуточном соединении 50 удаляют путем обработки фторидом тетрабутиламмония (TBAF) в протонном растворителе, таком как тетрагидрофуран, при комнатной температуре. Это фенольное промежуточное соединение вводят в реакцию в присутствии основания, такого как карбонат калия (K₂CO₃), в апротонном растворителе, таком как диметилформамид (DMF), с 3-N-трет-
40 бутилкарбонат-1-бромпропаном. Таким образом получают промежуточное соединение 52, которое при снятии защиты с помощью трифторуксусной кислоты (TFA) и последующем гидролизе с помощью основания, такого как гидроксид натрия, в протонном растворителе, таком как этанол, образует промежуточное соединение 39:

45

5

10

15

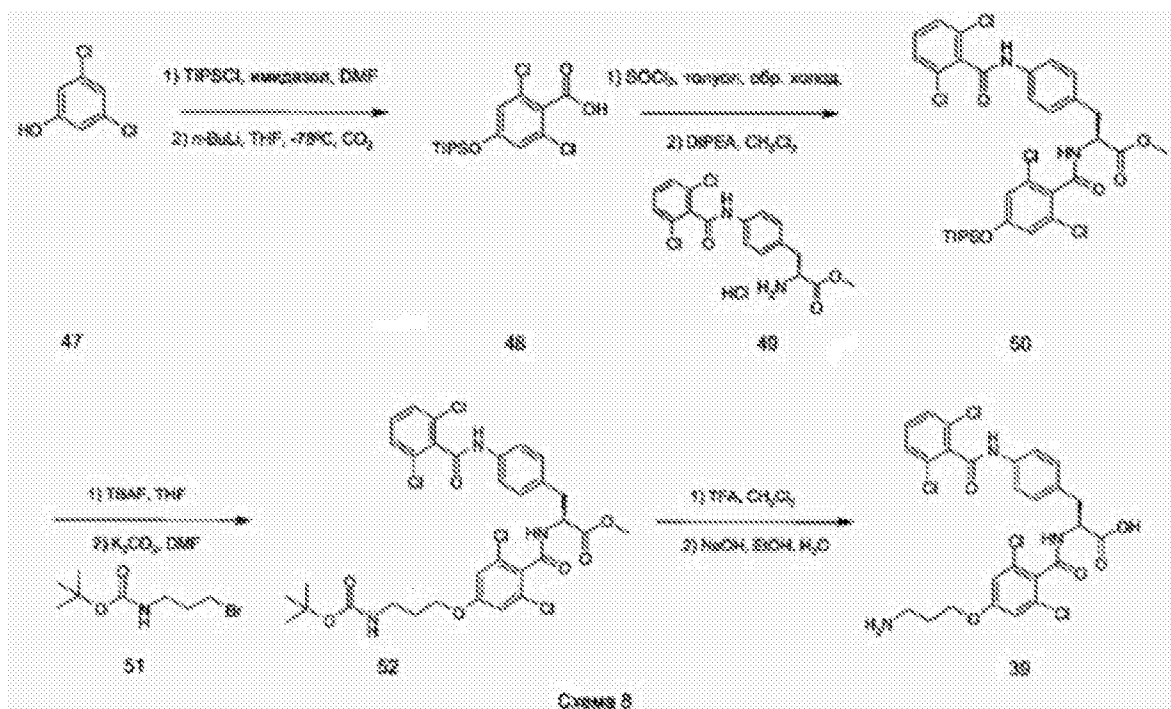


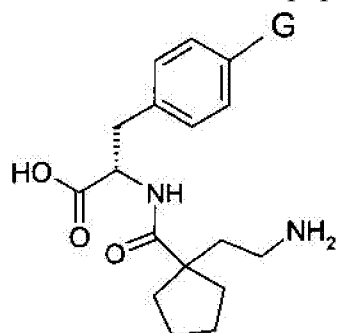
Схема 8

Синтез дериватизирующих агентов антагонистов VLA-4

20

Синтез соединения формулы:

25

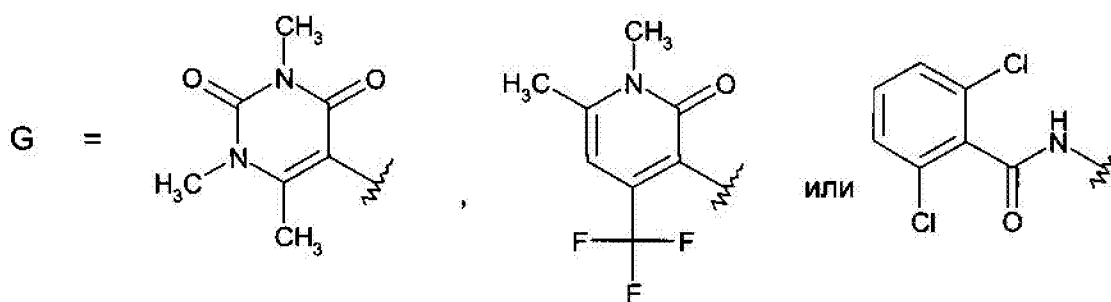


53

30

где:

35



40

можно эффективно осуществлять в соответствии со Схемой 9:

45

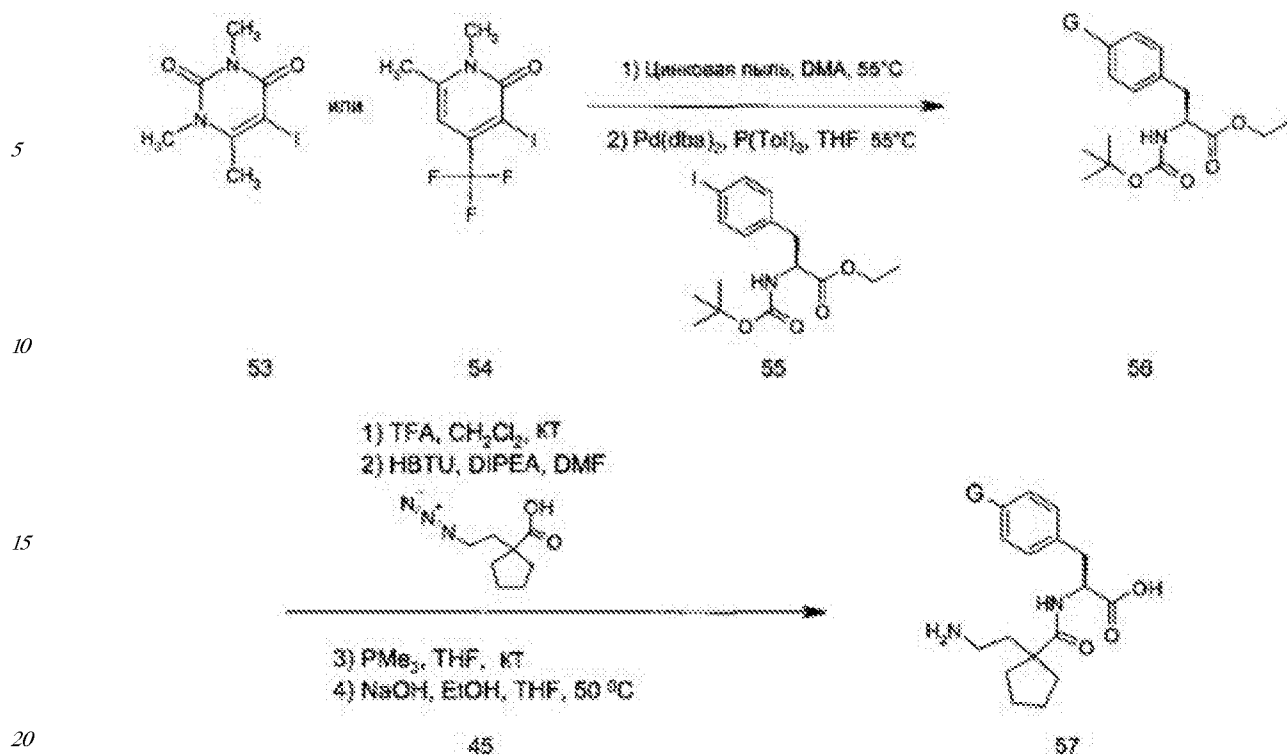
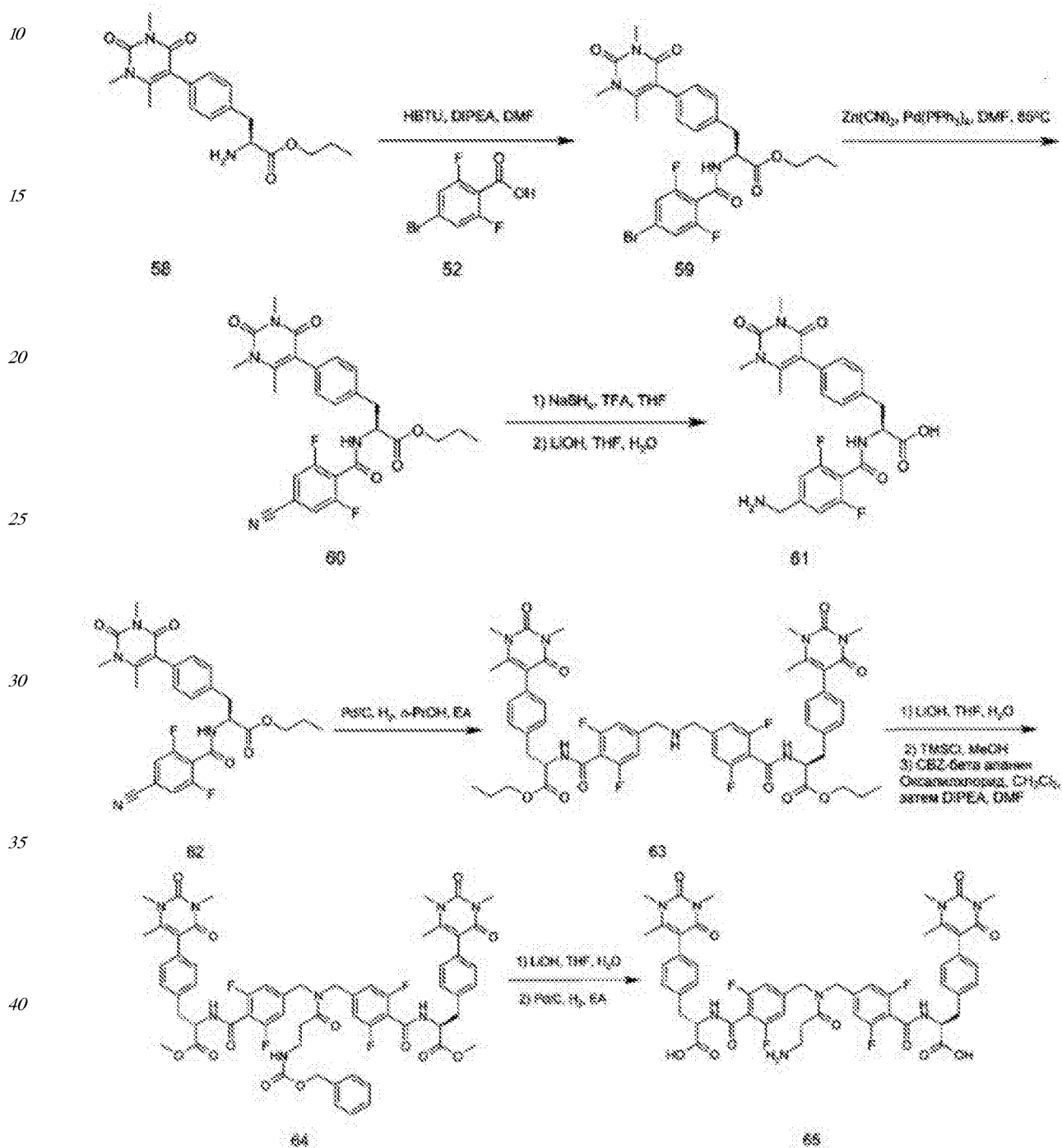


Схема 9

Кольцевые системы, представленные радикалом G, отличные от 2,6-дихлорбензоила, можно внедрять в промежуточное соединение 55, как показано на схеме 9. Затем промежуточное соединение 55 переводят в форму, удобную для последующего сочетания таким же образом, как показано на схеме 7, с получением целевой молекулы, подготовленной к конденсации по Схеме 4, по пути получения соединения формулы I. Подробное описание способов синтеза для получения промежуточного соединения 53 на выше представленной схеме 9 опубликованы в следующих источниках: Патенты США №№6388084 В1 и 6380387 В1. Вкратце, арил- или гетероарильные цинк-содержащие реагенты получают из известных промежуточных продуктов 53 или 54 в безводном растворителе, таком как диметилацетамид (DMA). При этом цинк-содержащие реагенты вводят в реакцию коммерчески доступным этиловым эфиром (S)-2-трет-бутоксикарбониламино-3-(4-иод)фенил]пропионовой кислоты 55 в присутствии палладиевого катализатора, такого как Pd(dba)₂, в присутствии лигандов палладия тритолуилфосфина в апротонном растворителе, таком как тетрагидрофуран (THF) при 50°C. Таким образом, получают промежуточное соединение общей структуры 56. Промежуточное соединение 56 затем превращают в промежуточное соединение 57 в четыре стадии, как показано на Схеме 7.

Можно также получить димерные нацеленные мотивы антагониста VLA-4 в соответствии со способом синтеза, представленным на схеме 10. При этом промежуточное соединение 58, которое можно получить таким же способом, как описано выше на схеме 9, вводят в реакцию с реагентами, способствующими образованию амидной связи, такими как HBTU и основание DIPEA, в апротонном растворителе DMF, в присутствии 4-бром-2,6-дифторбензойной кислоты 52 согласно схеме 10. Получаемое промежуточное соединение 59 обрабатывают дицианоцинком в присутствии тетракис(трифенилфосфин)палладия(0) фосфина в растворителе, таком как тетрагидрофуран, с образованием циано-замещенного продукта, промежуточного соединения 60. Путем гидрирования в n-пропанол газобразным водородом, с

палладием на угле в качестве катализатора, при комнатной температуре, получают промежуточный вторичный амин 63. На этой стадии ди-пропиловый эфир превращают в ди-метиловый эфир, а затем проводят реакцию с хлоридом кислоты N-Cbz-бета-аланина в присутствии основания, такого как ди-изопропилэтиламин, получая при этом промежуточное соединение 64. Это промежуточное соединение омыляют водным основанием, и N-Cbz-группу удаляют путем каталитического гидрогенолиза с получением димерного антагониста VLA-4 аминокислоты 65, как показано на схеме 10.



ПОЛЕЗНОСТЬ

Соединения формулы I полезны для доставки конъюгированных молекул, такие как терапевтические вещества, низкомолекулярные вещества, пептиды, нуклеиновые

кислоты, флуоресцирующие молекулы и полимеры, к клеткам-мишеням, экспрессирующим комплексы рецептора интегрина VLA-4 в различных терапевтических целях и других типов применения. Таким образом, соединения формулы I можно применять для лечения различных заболеваний и состояний, связанных с экспрессией или сверхэкспрессией VLA-4. Такие заболевания и состояния могут включать воспалительные, раковые и метаболические заболевания.

В конкретных воплощениях настоящее изобретение включает способ лечения или профилактики рака у млекопитающих (предпочтительно у человека), нуждающихся в таком лечении, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения формулы I. Такие композиции можно вводить в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в данном контексте, включают конкретное расстройство, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, которого нужно лечить, клиническое состояние индивидуального пациента, причину расстройства, сайт доставки агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные лечащим врачам. "Эффективное количество" соединения, которое нужно ввести, определяют с учетом этих факторов как минимальное количество, необходимое для лечения или профилактики данного заболевания или состояния (например, для ингибирования экспрессии целевого белка), не допуская неприемлемой токсичности. Например, такое количество может быть ниже количества, которое токсично для нормальных клеток или для млекопитающего в целом. Такие композиции, содержащие соединение формулы I по настоящему изобретению, можно вводить парэнтерально, внутривенно и внутримышечно. Парэнтеральные инфузии включают внутривенное, внутримышечное, внутриаортальное, внутривенное или подкожное введение.

ПРИМЕРЫ

Понимание настоящего изобретения будет более полным со ссылкой на ниже следующие примеры. Однако их не следует воспринимать как ограничение объема настоящего изобретения.

Реагенты приобретали в компаниях Aldrich, Sigma и Pierce Bioscience или у других поставщиков, указанных ниже, и использовали без дополнительной очистки. Очистку в масштабе от нескольких миллиграмм до нескольких грамм проводили способами, известными специалистам в данной области техники, такими как элюирование с колонки для флэш-хроматографии с силикагелем. В некоторых случаях проводили также очистку с помощью препаративной флэш-хроматографии на колонке с использованием одноразовых предварительно упакованных мультиграммовых колонок с силикагелем (RediSep), элюировали с использованием системы CombiFlash. В целях данного изобретения для очистки промежуточных продуктов можно применять также устройства для колоночной флэш-хроматографии Biotage™ и ISCO™.

Для оценки чистоты и идентичности соединения снимали спектры LC/MS (жидкостная хроматография/масс-спектрометрия), с применением следующей системы. Система для получения масс-спектров представляла собой спектрометр Micromass Platform II: электроспрэй-ионизация в положительном режиме (диапазон масс: 150-1200 а.е.м.). Одновременное хроматографическое разделение осуществляли с помощью следующей системы ВЭЖХ: колоночный картридж ES Industries Chromegabond WR C-18 3u 120Å (3,2×30 мм); подвижная фаза А: вода (0,02% TFA) и фаза В: ацетонитрил (0,02% TFA); градиент от 10% В до 90% В за 3 минуты; время уравнивания 1 минута; скорость потока 2 мл/мин. В некоторых случаях использовали ацетат аммония в 20-миллимолярной концентрации в качестве модификатора эффективной ионизации в ходе

препаративной ВЭЖХ. В таких случаях выделяли соль аммония.

В некоторых случаях разделения может быть также полезно применение суперкритической флюидной хроматографии. Разделение суперкритической флюидной хроматографией осуществляли с применением системы Mettler-Toledo Minigram в следующих стандартных условиях: 100 бар; 30°C; 2,0 мл/мин; элюировали с колонки AD 12 мм с 40% MeOH в суперкритическом флюиде CO₂. Если аналиты содержали основные аминогруппы, добавляли 0,2% изопропиламин к метанольному модификатору.

Соединения характеризовали либо с помощью ¹H-ЯМР, с использованием ЯМР-спектрометра Varian Inova 400 МГц, либо или ЯМР-спектрометра Varian Mercury 300 МГц, а с помощью также масс-спектрометрии высокого разрешения с использованием масс-спектрометра высокого разрешения Bruker Apex-II 4.7T FT. Конечные соединения были охарактеризованы с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с помощью системы LTQ CL Orbitrap, поставляемой фирмой Thermo Electron.

Использована следующая аббревиатура:

	AIBN	2,2'-азобисизобутиронитрил
	Bu	бутил
	DCE	1,2-дихлорэтан
	DCM	дихлорметан
20	DBU	1,8-дизабицикло[5.4.0]ундец-7-ен
	DIAD	диизопропил азодикарбоксилат
	DIEA	диэтиламин
	DIPEA	диизопропилэтиламин
	DMF	N,N-диметилформамид
	DMSO	диметилсульфоксид
25	EDC-HCl	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидро-хлорид
	EtOAc	этилацетат
	EtOH	этиловый спирт
	FCC	колоночная флэш-хроматография
	h	час
30	HBTU	O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурионийгексафторфосфат
	HOBT	гидроксibenзотриазол
	ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
	HRMS	масс-спектры высокого разрешения
	LRMS	масс-спектры низкого разрешения
	LC	жидкостная хроматография
35	L-Pro	L-пролин
	MCPBA	мета-хлорпероксибензойная кислота
	MeOH	метиловый спирт
	MW	микроволны
	NIS	N-иодсукцинимид
	NBS	N-бромсукцинимид
40	NMP	1-метил-2-пирролидинон
	PdCl ₂ (dppf)	[1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий (II)
	ПЭГn	полиэтиленгликоль с n повторами (например, ПЭГ2 = -OCH ₂ CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ -)
	PG	защитная группа
45	PuBroP	бром-трис-пирролидино-фосфоний гексафторфосфат
	КТ	комнатная температура
	TBAF	фторид тетрабутиламмония
	TBDMS	трет-бутил-диметилсилил
	TBTU	2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионий тетрафторборат

TMS
TEA
TFA
THF
TSCX
TRP

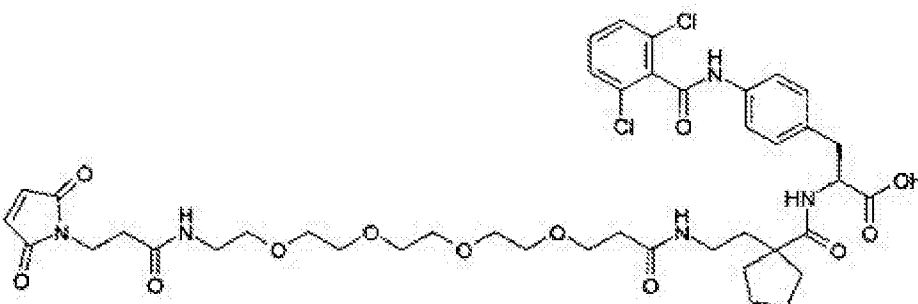
триметилсиллил
триэтиламин
трифторуксусная кислота
тетрагидрофуран
тонкослойная хроматография
трифенилфосфин

СИНТЕЗ СОЕДИНЕНИЙ, НАЦЕЛИВАЮЩИХ К VLA-4

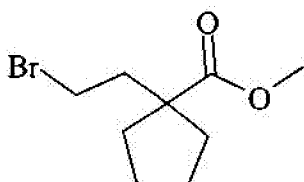
Пример 1

(S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-[[1-[2-[3-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино]этил]циклопентанкарбонил]амино]пропионовая кислота;

VLA-4 Лиганд - Реагент 1:

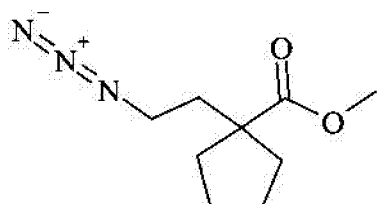


Стадия 1: получение метилового эфира 1-(2-бромэтил)циклопентанкарбоновой кислоты:



К раствору диизопропиламина (56 мл; 396 ммоль) в THF (85 мл) добавляли по каплям раствор н-бутиллития (240 мл; 393 ммоль; 1,6M) в гексане при -10°C , при этом температуру поддерживали ниже 0°C . По окончании внесения раствор перемешивали в течение 30 мин при 0°C . К этой смеси добавляли по каплям раствор метилового эфира циклопентанкарбоновой кислоты (37,4 г; 263 ммоль) в THF (50 мл) при -70°C , выдерживая внутреннюю температуру в интервале от -60 до -70°C . По окончании внесения реакцию смесь перемешивали в течение 1 ч в интервале от -50 до -60°C . Затем добавляли по каплями раствор 1,2-дибромэтана (47 мл; 545 ммоль) в THF (50 мл), и полученную светло-коричневую суспензию перемешивали в течение 1 ч при температуре от -70 до -60°C . Затем ее нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь вливали в насыщенный водный раствор хлорида аммония (200 мл) и органическое вещество экстрагировали эфиром (2×100 мл). Объединенные экстракты промывали насыщенным раствором хлорида натрия (150 мл) и высушивали над безводным сульфатом магния. Отфильтровывали осушитель, после чего полученный раствор концентрировали в вакууме и полученный остаток перегоняли при $95-105^{\circ}\text{C}/2,5$ мм Hg с получением 49,6 г (выход 80%) метилового эфира 1-[2-бромэтил]циклопентанкарбоновой кислоты в виде бесцветного масла.

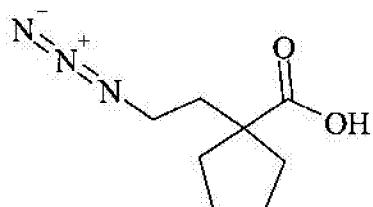
Стадия 2: получение метилового эфира 1-[2-азидоэтил]циклопентанкарбоновой кислоты:



10 Раствор метилового эфира 1-[2-бромэтил]циклопентанкарбоновой кислоты (49,6 г; 211 ммоль) и азид натрия (54 г; 831 ммоль) в DMF (200 мл) перемешивали при 50°C в течение 5 ч в атмосфере азота. Затем твердые вещества отфильтровывали, а фильтрат концентрировали практически досуха. Остаток разводили в этилацетате (500 мл) и не растворившиеся твердые вещества собирали фильтрацией, и фильтрат концентрировали с получением неочищенного этил-1-(2-азидоэтил)циклопентанкарбоксилата, который очищали хроматографией на 250 г силикагеля, элюировали 5% этилацетатом в гексане, с получением 36,2 г (выход 87%) метилового эфира 1-[2-азидоэтил]

15 циклопентанкарбоновой кислоты в виде светло-коричневого масла. EI(+)-HRMS m/e расч. для C₉H₁₅N₃O₂ (M-H)⁺ 196,1086, наблюд. 196,1342.

Стадия 3: получение 1-[2-азидоэтил]циклопентанкарбоновой кислоты:

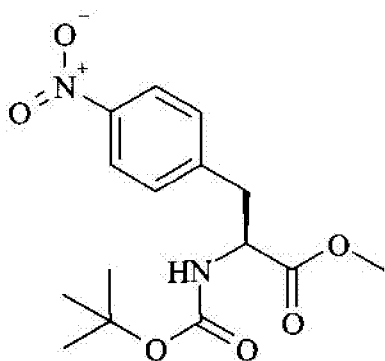


25 Метилловый эфир 1-[2-азидоэтил]циклопентанкарбоновой кислоты (36,2 г; 184 ммоль) растворяли в THF (500 мл) и метаноле (250 мл) и добавляли раствор LiOH моногидрата (15,44 г; 368 ммоль) в воде (300 мл). Полученный раствор перемешивали при 40°C в течение ночи и концентрировали. Остаток растворяли в 1 л воды, содержащей 40 мл 1 н NaOH, и промывали гексаном (500 мл). Водный слой подкисляли 1 н хлороводородной кислотой и полученное органическое вещество экстрагировали эфиром (2×500 мл).

30 Объединенные экстракты промывали насыщенным раствором хлорида натрия и органический слой высушивали над безводным Na₂SO₄. Отфильтровывали осушитель и концентрировали с получением 32,5 г (выход 96%) 1-[2-азидоэтил]-циклопентанкарбоновой кислоты в виде жидкости янтарного цвета. ES(+)-HRMS m/e расч. для C₈H₁₃N₃O₂ (M+Na)⁺ 206,0900; наблюд. 206,0900.

35

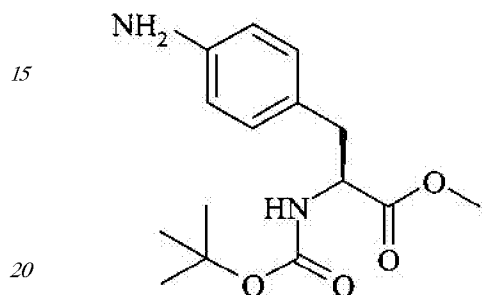
Стадия 4: получение метилового эфира (S)-3-[4-нитрофенил]-2-трет-бутоксикарбониламинопропионовой кислоты:



К суспензии (S)-3-[4-нитрофенил]-2-трет-бутоксикарбониламино-пропионовой кислоты (70,2 г; 226,2 ммоль) и карбоната натрия (95 г; 1,13 моль) в DMF (500 мл)

добавляли при комнатной температуре метилиодид (70,4 мл; 1,13 моль). Эту суспензию перемешивали в течение 15 ч при комнатной температуре, при этом анализ смеси с помощью ТСХ показал отсутствие исходного вещества, и избыток метилиодида и некоторого количества DMF удаляли в высоком вакууме. Затем смесь вливали в воду (2 л) и перемешивали при комнатной температуре, при этом медленно образовывался осадок в течение 72 ч. Выпавшее в осадок твердое вещество собирали фильтрацией и промывали водой (2 л). После высушивания на воздухе и в вакууме выделяли 72 г (выход 98%) метилового эфира (S)-3-[4-нитрофенил]-2-трет-бутоксикарбониламинопропионой кислоты в виде светло-желтого твердого вещества (mp 95-96°C). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₁₅H₂₀N₂O₆ (M+H)⁺ 325,1400; наблюд. 325,1404.

Стадия 5: получение метилового эфира (S)-3-[4-аминофенил]-2-трет-бутоксикарбониламинопропионой кислоты:

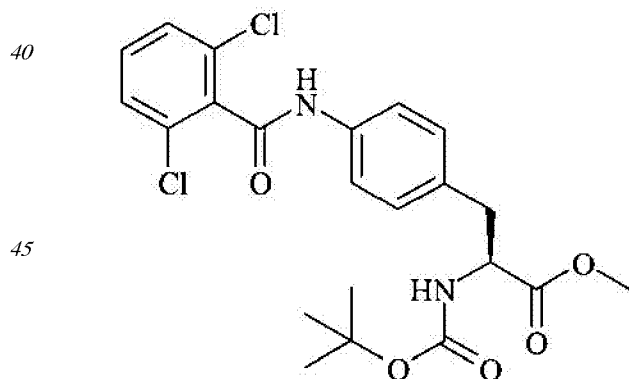


К смеси метилового эфира метил-(S)-3-[4-нитрофенил]-2-трет-бутоксикарбониламинопропионой кислоты (72 г; 222 ммоль), цинковой пыли (~325 меш, 145,2 г; 2,2 моль, 10 эквив.) и хлорида аммония (178,1 г; 3,3 моль, 15 эквив.) добавляли при комнатной температуре метанол (1 л) и воду (500 мл). В результате добавления воды протекала экзотермическая реакция, и внутренняя температура поднималась до 45-50°C. Эту суспензию перемешивали в течение от 30 мин до 1 ч при комнатной температуре, при этом анализ смеси с помощью ТСХ показал отсутствие исходного вещества, реакцию смесь фильтровали через слой Celite и осадок на фильтре промывали метанолом (1 л) и водой (500 мл). Концентрировали с целью удаления большей части метанола и некоторого количества воды, в результате чего получали белое твердое вещество, которое собирали фильтрацией и промывали водой. После высушивания на воздухе выделяли 65,5 г (выход 100%) метилового эфира (S)-3-[4-аминофенил]-2-трет-бутоксикарбониламинопропионой кислоты в виде белого

35

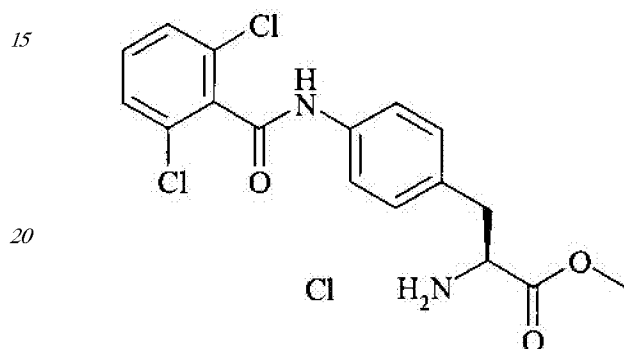
твердого вещества (m.p. 86-89°C). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₁₅H₂₂N₂O₄ (M+H)⁺ 294,1621; наблюд. 294,1614.

Стадия 6: получение метилового эфира (S)-2-трет-бутоксикарбониламино-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионой кислоты:



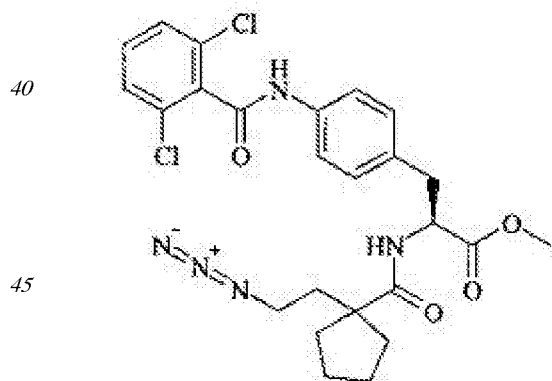
К раствору метилового эфира (S)-3-[4-аминофенил]-2-трет-
бутоксикарбониламинопропионовой кислоты (37,57 г; 127,6 ммоль) и 2,6-
дихлорбензоилхлорида (29,45 г; 140,6 ммоль) в дихлорметане (350 мл) добавляли DIPEA
(24,8 г; 192 ммоль) при комнатной температуре. Полученный коричневый раствор
5 перемешивали в течение 15 ч при комнатной температуре с получением белой суспензии,
при этом анализ смеси с помощью ТСХ показал отсутствие исходного вещества. Затем
твердые вещества собирали фильтрацией, и твердое вещество промывали дихлорметаном
(150 мл) и высушивали на воздухе с получением 52,75 г (выход 88,4%) метилового эфира
(S)-2-трет-бутоксикарбониламино-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой
10 кислоты в виде белого твердого вещества: т.п. 192-194°C. ES(+)-HRMS m/e расч. для
 $C_{22}H_{24}Cl_2N_2O_5$ (M+H)⁺ 466,1062; наблюд. 466,1069.

Стадия 7: получение метилового эфира (S)-2-амино-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)
фенил]пропионовой кислоты, гидрохлоридной соли:



Твердый метиловый эфир (S)-2-трет-бутоксикарбониламино-3-[4-(2,6-
дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты (43,45 г; 92,97 ммоль) в диоксане
25 (90 мл) обрабатывали при комнатной температуре с помощью 166 мл 4,0 н
хлороводородной кислоты в диоксане. Через 5 минут твердое вещество переходило в
раствор и смесь перемешивали в течение 2 ч. Затем некоторое количество диоксана
удаляли в вакууме с получением желтого сиропа и вносили 250 мл этилового эфира.
30 Образовывалась смола, которую растворяли в THF (100 мл) и метаноле (100 мл).
Растворитель удаляли в вакууме с получением 43,7 г (выход 100%) метилового эфира
(S)-2-амино-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)-фенил]пропионовой кислоты,
гидрохлоридной соли, в виде белого твердого вещества: гл.р. 180-195°C. Это вещество
хранили в холодильнике в атмосфере аргона. ES(+)-HRMS m/e расч. для $C_{17}H_{16}Cl_2N_2O_3$
35 (M+H)⁺ 367,0616; наблюд. 367,0611.

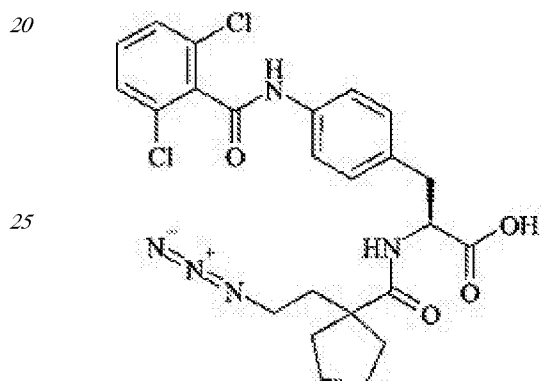
Стадия 8: получение метилового эфира (S)-2-[[1-(2-азидоэтил)циклопентанкарбонил]
амино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты:



К раствору метилового эфира (S)-2-амино-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)-фенил]

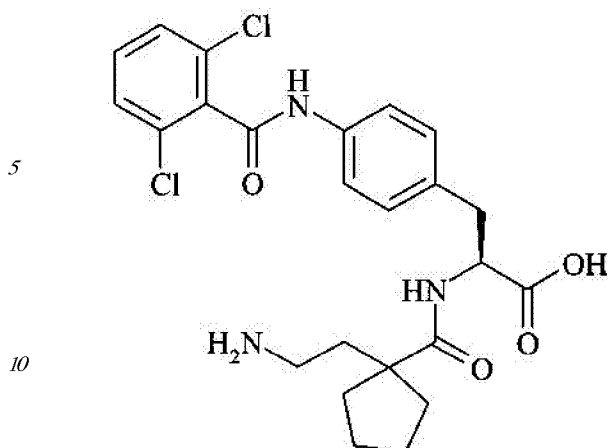
пропионовой кислоты, гидрохлоридной соли, (10 г; 24,79 ммоль) и метилового эфира 1-[2-азидоэтил]циклопентанкарбонической кислоты (5,0 г; 27,29 ммоль) в DMF (100 мл) добавляли при комнатной температуре HBTU (10,37 г; 27,33 ммоль) и DIPEA (8,82 г; 68,3 ммоль). Полученный прозрачный раствор перемешивали в течение 48 ч при 5 комнатной температуре и к реакционной смеси добавляли воду (~200 мл) для осаждения продукта. Полученное твердое вещество собирали фильтрацией и промывали водой (100 мл) и гексаном (~100 мл). После высушивания на воздухе получали 11,2 г продукта в виде светло-кирпичного твердого вещества, которое обрабатывали ацетонитрилом (100 мл) в горячих условиях. Все примеси переходили в ацетонитрил, и твердое вещество 10 собирали фильтрацией с получением 8,24 г продукта конденсации. Ацетонитрильный раствор выпаривали в вакууме, остаток растворяли в этилацетате и осаждали продукт добавлением гексана. Твердое вещество снова собирали фильтрацией и высушивали на воздухе с получением еще 2,03 г (общий выход 78%) метилового эфира (S)-2-[[1-(2-азидоэтил)циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоил-амино)фенил] 15 пропионовой кислоты в виде белого твердого вещества. ES(+)-HRMS m/e расч. для C₂₅H₂₇Cl₂N₅O₄ (M+Na)⁺ 554,1332; наблюд. 554,1334.

Стадия 9: получение (S)-2-[[1-(2-азидоэтил)циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты:



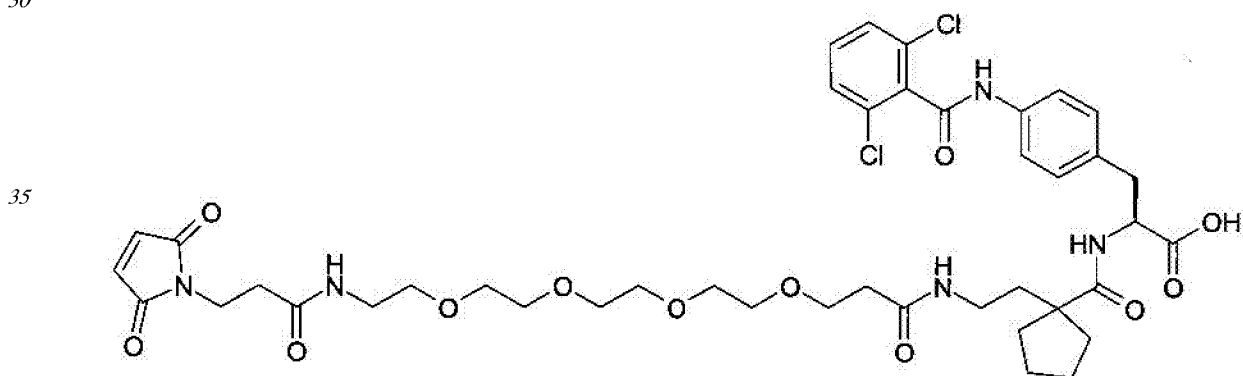
30 К суспензии метилового эфира (S)-2-[[1-(2-азидоэтил)циклопентан-карбонил]амино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты (14,77 г; 27,7 ммоль) в THF (200 мл) и этаноле (200 мл) добавляли водный 1,0 н гидроксид натрия (150 мл) при 35 комнатной температуре. Эту смесь перемешивали в течение 15 ч при комнатной температуре, при этом анализ смеси с помощью ТСХ показал отсутствие исходного вещества. Затем смесь разбавляли водой (20 мл), удаляли THF и этанол на роторном 40 испарителе, разбавляли с помощью 100 мл воды и экстрагировали эфиром (200 мл) для удаления всех нейтральных примесей. Водный слой нейтрализовали с помощью 1 н HCl, полученное белое твердое вещество собирали фильтрацией и промывали водой и гексаном. После высушивания на воздухе получали 13,37 г (выход 93%) (S)-2-[[1-(2-азидоэтил)циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-пропионовой кислоты в виде белого твердого вещества. ES(+)-HRMS m/e расч. для C₂₄H₂₅Cl₂N₅O₄ (M+Na)⁺ 540,1176; наблюд. 540,1177.

45 Стадия 10: получение (S)-2-[[1-(2-аминоэтил)циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты; VLA-4 Лиганд-1



К раствору (S)-2-[[1-(2-азидоэтил)циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(2,6-
 15 дихлорбензоиламино)фенил]пропионой кислоты (6,28 г; 12,11 ммоль) в THF (91 мл)
 добавляли раствор триметилфосфина в THF (48,5 мл; 48,46 ммоль; 1,0 М) при 0°C.
 Сначала смесь представляла собой прозрачный раствор, а через 30 мин образовалось
 небольшое количество осадка, полученную смесь перемешивали в течение в течение
 ночи, при этом анализ смеси с помощью ТСХ показал отсутствие исходного вещества.
 Затем вносили 10 эквивалентов воды (120 ммоль; 2,16 мл) и эту смесь перемешивали
 20 при комнатной температуре в течение 2 ч. Растворитель удаляли в вакууме и дважды
 проводили азеотропную перегонку остатка с толуолом с получением пастообразного
 вещества, которое очищали с помощью ВЭЖХ с получением 4,57 г (выход 77%) (S)-2-
 [[1-(2-аминоэтил)циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]
 -пропионой кислоты в виде аморфного белого твердого вещества. ES(+)-HRMS m/e
 25 расч. для C₂₄H₂₇Cl₂N₃O₄ (M+H)⁺ 492,1452; наблюд. 492,1451.

Стадия 11: получение (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-[[1-[2-[3-[2-[2-[2-
 [2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]-
 30 [2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этил]циклопентанкарбонил]амино]пропионой кислоты;
 VLA-4 Лиганд - Реагент 1):



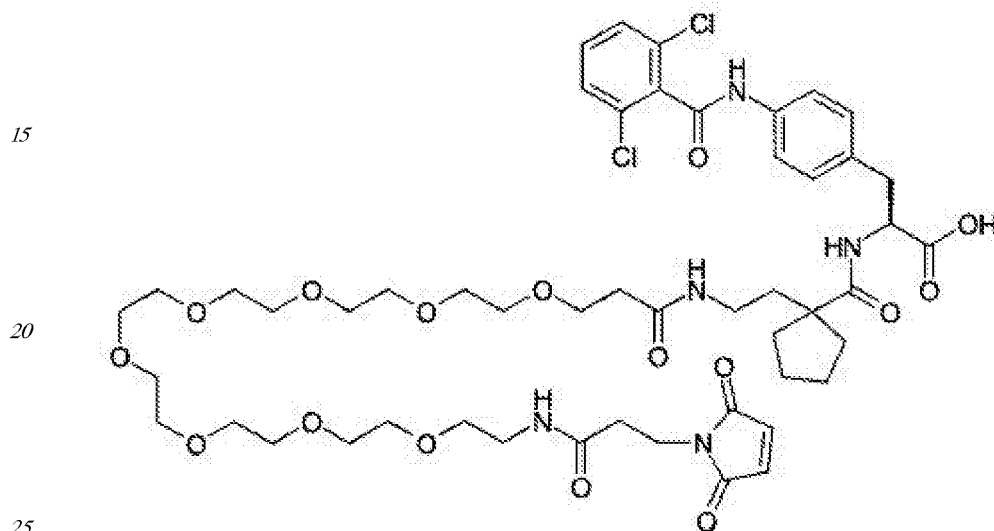
К раствору (S)-2-[[1-(2-аминоэтил)циклопентанкарбонил]амино]3-[4-(2,6-
 45 дихлорбензоиламино)фенил]пропионой кислоты (191,5 мг; 0,39 ммоль) и 2,5-
 диоксопирролидин-1-илового эфира 3-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)-
 пропиониламино]-этокси]этокси]этокси]этокси]пропионой кислоты (200 мг; 0,39
 ммоль) в DMSO (2 мл) добавляли при комнатной температуре, в атмосфере азота
 избыток DIPEA (151 мг; 203 мкл; 1,17 ммоль). Полученный светло-желтый раствор
 перемешивали в течение 1 ч, при этом анализ с помощью LCMS показал отсутствие
 исходного вещества. Затем избыток DIPEA удаляли в вакууме и желаемый продукт

выделяли в ходе очистки с помощью ВЭЖХ с получением 90 мг (выход 26%) (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-[[1-[2-[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]-пропиониламино]этил]циклопентанкарбонил]амино]пропионовой кислоты в виде белого твердого вещества.

5 ES(+)-HRMS m/e расч. для $C_{42}H_{53}Cl_2N_5O_{12}$ (M+H)⁺ 890,3141; наблюд. 890,3140.

Пример 2

Получение (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-[[[1-[2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]этил]циклопентил]карбонил]-амино]пропионовой кислоты; VLA-4 Лиганд - Реагент 2:

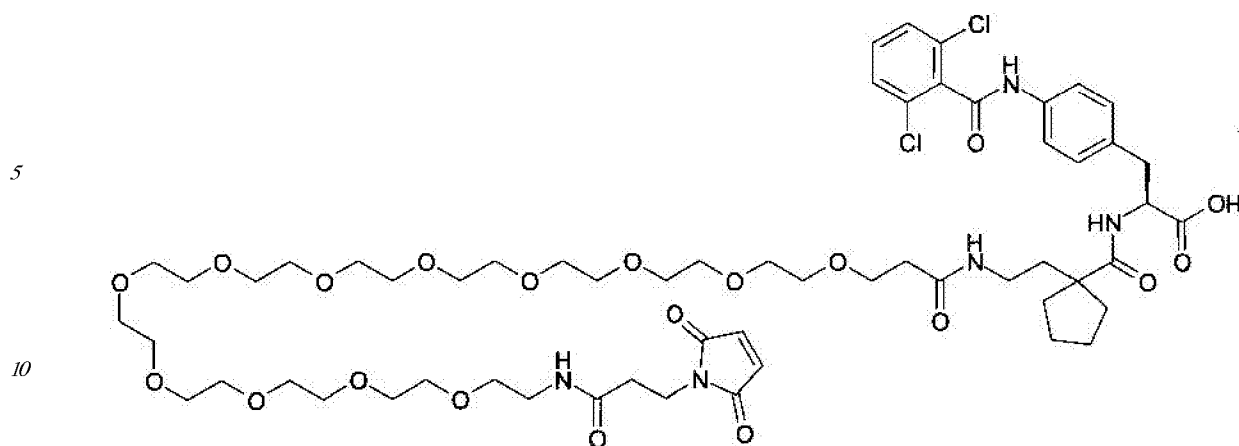


Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 11, исходя из (S)-2-[[1-(2-аминоэтил)-циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты (607 мг; 1,0 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]-этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропионовой кислоты (689 мг; 1,0 ммоль) и DIPEA (388 мг; 522 мкл; 3,0 ммоль) и после очистки с помощью ВЭЖХ, с получением светло-желтого твердого вещества (788 мг; 74%). ES(+)-HRMS m/e расч. для $C_{50}H_{69}Cl_2N_5O_{16}$ (M+H)⁺ 1066,4189; наблюд. 1066,4182.

Пример 3

Получение (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-[[[1-[2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]этил]циклопентанкарбонил]амино]пропионовой кислоты; VLA-4 Лиганд - Реагент 3:

45



Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 11, исходя из (S)-2-[[1-(2-аминоэтил)-циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты (100 мг; 0,2 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]-пропионовой кислоты (176 мг; 0,2 ммоль) и DIPEA (258 мг; 191 мкл; 2,0 ммоль) и после очистки с помощью ВЭЖХ, с получением белого твердого вещества (28 мг; 11%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₅₈H₈₅Cl₂N₅O₂₀ (M+H)⁺ 1242,5238; наблюд. 1242,5248.

15

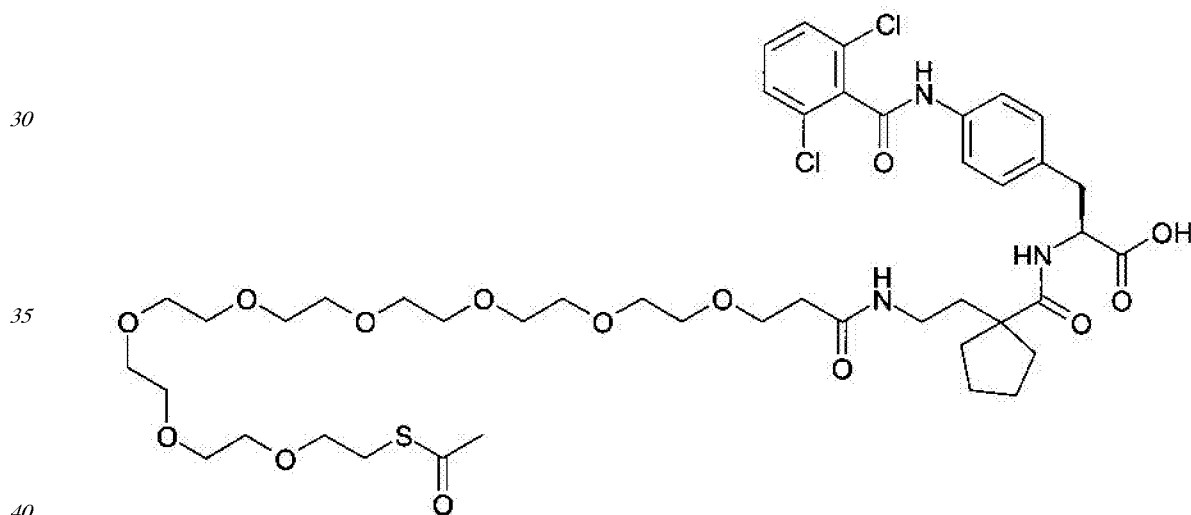
20

Пример 4

Получение (S)-2-[[1-[2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-ацетилсульфанилэтоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино]этил]циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты;

25

VLA-4 Лиганд - Реагент 4:

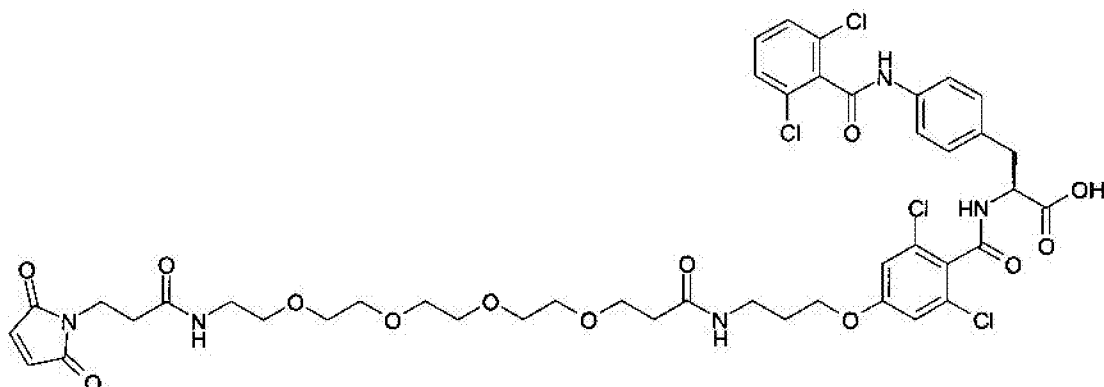


Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 11, исходя из (S)-2-[[1-(2-аминоэтил)циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты (194 мг; 0,32 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-ацетилсульфанилэтоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]-пропионовой кислоты (190 мг; 0,32 ммоль) и DIPEA (124 мг; 167 мкл; 0,96 ммоль) и после очистки с помощью ВЭЖХ, с получением желтого вязкого масла (220 мг; 70%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₄₅H₆₅Cl₂N₃O₁₄S (M+H)⁺ 974,3637; наблюд. 974,3631.

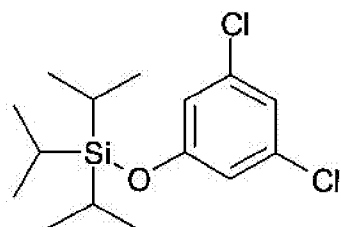
45

Пример 5

(S)-3-[4-(2,6-Дихлорбензоиламино)фенил]-2-[2,6-дихлор-4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]-пропиониламино]пропокси]бензоиламино]пропионовая кислота; VLA-4 Лиганд -
 Реагент 5:

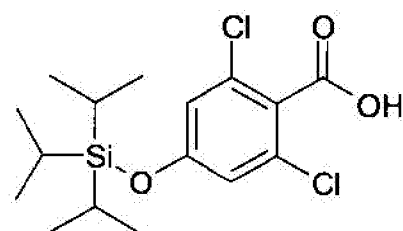


Стадия 1: получение (3,5-дихлорфенокси)-триизопропилсилана



К смеси 3,5-дихлорфенола (16,3 г; 100 ммоль), имидазола (14,98 г; 220 ммоль) и триизопропилхлорсилана (21,21 г; 110 ммоль) добавляли при комнатной температуре DMF (200 мл). Полученный коричневый раствор перемешивали в течение 15 ч и затем его разбавляли водой (500 мл). Органическое соединение экстрагировали этилацетатом (2×100 мл) и объединенные органические слои промывали солевым раствором и высушивали над безводным MgSO₄. Фильтровали и концентрировали с получением неочищенного остатка, который очищали хроматографией на колонке ISCO (400 г) с получением 31,1 г (97%) (3,5-дихлорфенокси)триизопропилсилана в виде бесцветного масла. EI(+)-HRMS m/e расч. для C₁₅H₂₄Cl₂OSi (M)⁺ 318,0973; наблюд. 318,0971.

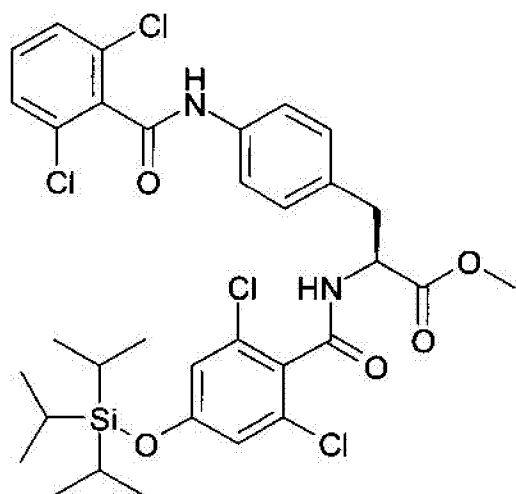
Стадия 2: получение 2,6-дихлор-4-триизопропилсиланилоксибензойной кислоты:



К раствору THF (110 мл) добавляли при -78°C раствор н-бутиллития (28 мл; 70 ммоль; 2,5M) в гексане и тетраметилэтилендиамин (8,42 г; 10,94 мл; 72,45 ммоль). Полученный светло-желтый раствор перемешивали в течение 30 мин при этой температуре и затем в течение 30 минут добавляли по каплям раствор (3,5-дихлорфенокси)-триизопропилсилана (15,97 г; 50 ммоль) в THF (20 мл). Полученный светло-желтый раствор перемешивали в течение 3 ч и затем через реакционную смесь пропускали газообразный диоксид углерода. В ходе барботирования CO₂ цвет реакционной смеси менялся от коричневого до светло-желтого раствора в течение 10 минут, и

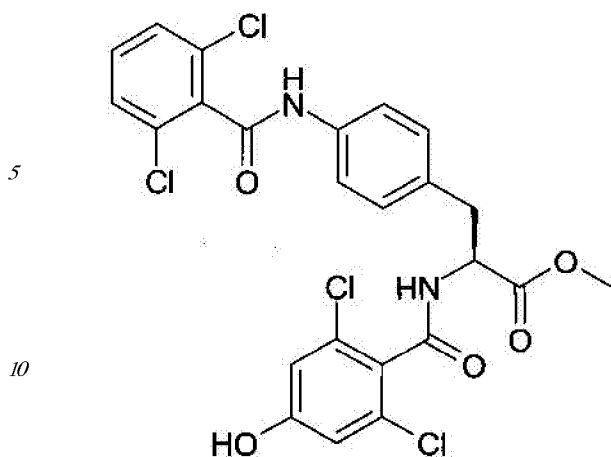
барботирование продолжали в течение 1 ч при -75, затем смесь нагревали до комнатной температуры в течение 30 при непрерывном пропускании CO₂. Затем смесь вливали в 1 н раствор HCl и полученное органическое вещество экстрагировали дихлорметаном (2×150 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором и высушивали над безводным MgSO₄. Фильтровали и концентрировали с получением неочищенного остатка, который очищали хроматографией на колонке ISCO (400 г) с получением 7,02 г (39%) 2,6-дихлор-4-триизопропилсиланилоксибензойной кислоты в виде белого твердого вещества. ES(+)-HRMS m/e расч. для C₁₆H₂₄Cl₂O₃Si (M+H)⁺ 363,0945; наблюд. 363,0944.

Стадия 3: получение метилового эфира (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-(2,6-дихлор-4-триизопропилсиланилоксибензоиламино)пропионовой кислоты:



К раствору 2,6-дихлор-4-триизопропилсиланилоксибензойной кислоты (3,63 г; 10 ммоль) в толуоле (50 мл) добавляли при комнатной температуре избыток тионилхлорида (11,89 г; 7,2 мл; 100 ммоль). Полученный бесцветный раствор кипятили с обратным холодильником в течение 5 ч и затем его охлаждали до комнатной температуры, и растворитель и избыток тионилхлорида удаляли в вакууме. Полученный остаток однократно очищали азеотропной перегонкой с толуолом. Затем полученный выше хлорид 2,6-дихлор-4-триизопропилсиланил-оксибензойной кислоты растворяли в дихлорметане (50 мл) и добавляли к нему при комнатной температуре твердую гидрохлоридную соль метилового эфира (S)-2-амино-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)-фенил]пропионовой кислоты, (4,1 г; 10 ммоль) и DIPEA (3,87 г; 5,26 мл; 30 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 15 ч при комнатной температуре и к реакционной смеси добавляли воду (~200 мл). Затем полученное органическое вещество экстрагировали дихлорметаном (2×150 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором и высушивали над безводным MgSO₄. Фильтровали и концентрировали с получением неочищенного остатка, который очищали хроматографией на колонке ISCO (120 г) с получением 6,48 г (95%) метилового эфира (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-(2,6-дихлор-4-триизопропилсиланилоксибензоиламино)пропионовой кислоты в виде белого твердого вещества. ES (+)-HRMS m/e расч. для C₃₃H₃₈Cl₄N₂O₅Si (M+H)⁺ 711,1377; наблюд. 711,1377.

Стадия 4: получение метилового эфира (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-(2,6-дихлор-4-гидроксibenзоиламино)пропионовой кислоты:

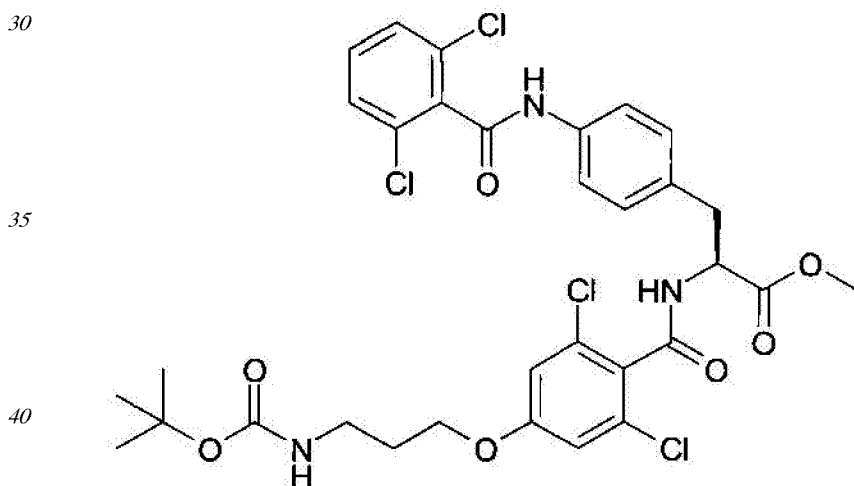


15 К раствору метилового эфира (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-(2,6-дихлор-4-триизопропилсиланилоксибензоиламино)пропионовой кислоты (6,76 г; 9,48 ммоль) в THF (150 мл) добавляли при 0°C раствор TBAF (14,22 мл; 14,22 ммоль; 1M) в THF. Полученный раствор медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 15 ч. Затем реакционную смесь разбавляли водой и полученное органическое вещество экстрагировали этилацетатом (2×150 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором и высушивали над безводным MgSO₄. Фильтровали и

20 концентрировали с получением неочищенного остатка, который растворяли в этилацетате в горячих условиях и затем разбавляли гексаном. Полученное твердое вещество собирали фильтрацией и промывали гексаном. После высушивания на воздухе получали 5,23 г (99%) метилового эфира (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-(2,6-дихлор-4-гидроксibenзоиламино)пропионовой кислоты в виде белого твердого

25 вещества. ES(+)-HRMS m/e расч. для C₂₄H₁₈Cl₄N₂O₅ (M-H)⁻ 552,9897; наблюд. 552,9897.

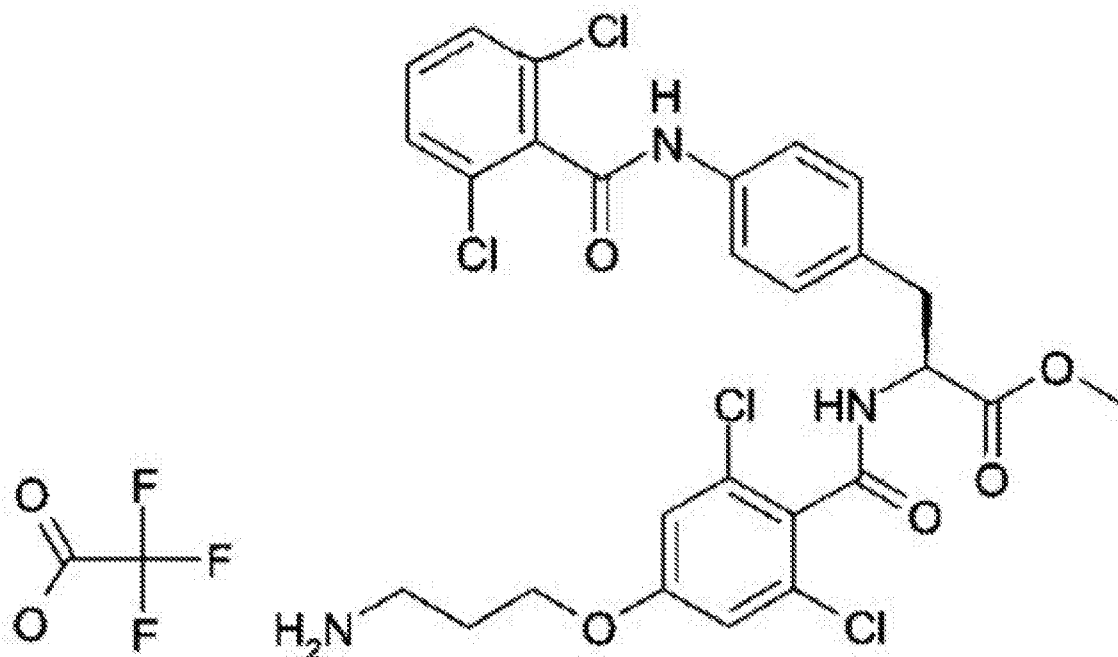
Стадия 5: получение метилового эфира (S)-2-[4-(3-трет-бутоксикарбониламинопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-пропионовой кислоты:



45 К смеси метилового эфира (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-(2,6-дихлор-4-гидроксibenзоиламино)пропионовой кислоты (5,05 г; 9,07 ммоль), 3-трет-бутоксикарбониламинопропилбромида (2,59 г; 10,89 ммоль) и карбоната калия (3,77 г; 27,29 ммоль) добавляли при комнатной температуре DMF (66 мл) и ацетон (132 мл). Затем полученную суспензию кипятили с обратным холодильником в течение 15 ч, при этом анализ с помощью ТСХ показал отсутствие исходного вещества. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой и

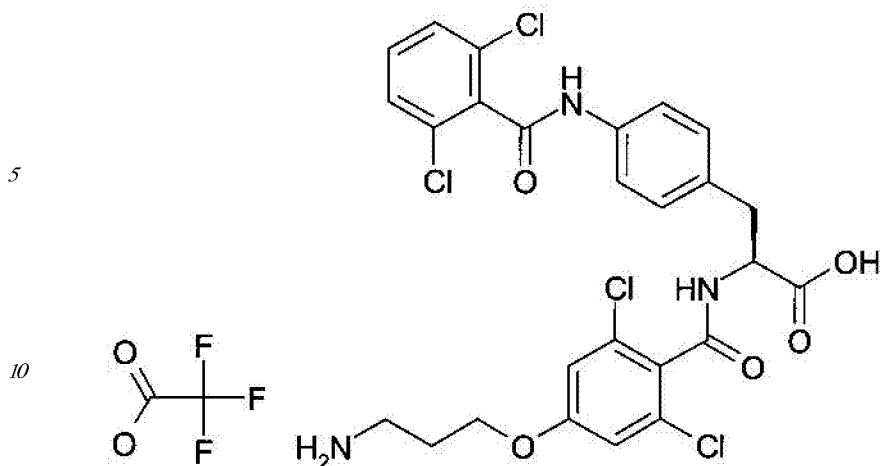
полученное органическое вещество экстрагировали этилацетатом (2×150 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором и высушивали над безводным MgSO₄. Фильтровали и концентрировали с получением неочищенного остатка, который очищали хроматографией на колонке ISCO (150 г) с получением 5,75 г (89%) метилового эфира (S)-2-[4-(3-трет-бутоксикарбониламинопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(2,6-дихлор-бензоиламино)фенил]пропионовой кислоты в виде белого твердого вещества. ES(+)-HRMS m/e расч. для C₃₂H₃₃Cl₄N₃O₇ (M+Na)⁺ 734,0965; наблюд. 734,0961.

Стадия 6: получение метилового эфира (S)-2-[4-(3-аминопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты:



К раствору метилового эфира (S)-2-[4-(3-трет-бутоксикарбониламинопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-пропионовой кислоты (7,5 г; 7,98 ммоль) в дихлорметане (100 мл) добавляли при комнатной температуре избыток TFA (9,12 г; 5,9 мл; 80 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 15 ч. Затем этот растворитель удаляли в вакууме и остаток однократно очищали азеотропной перегонкой с толуолом. После высушивания в высоком вакууме получали 5,8 г (99%) метилового эфира (S)-2-[4-(3-аминопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)-фенил]пропионовой кислоты в виде белого твердого вещества. ES(+)-HRMS m/e расч. для C₂₇H₂₅Cl₄N₃O₅ (M+H)⁺ 612,0621; наблюд. 612,0619.

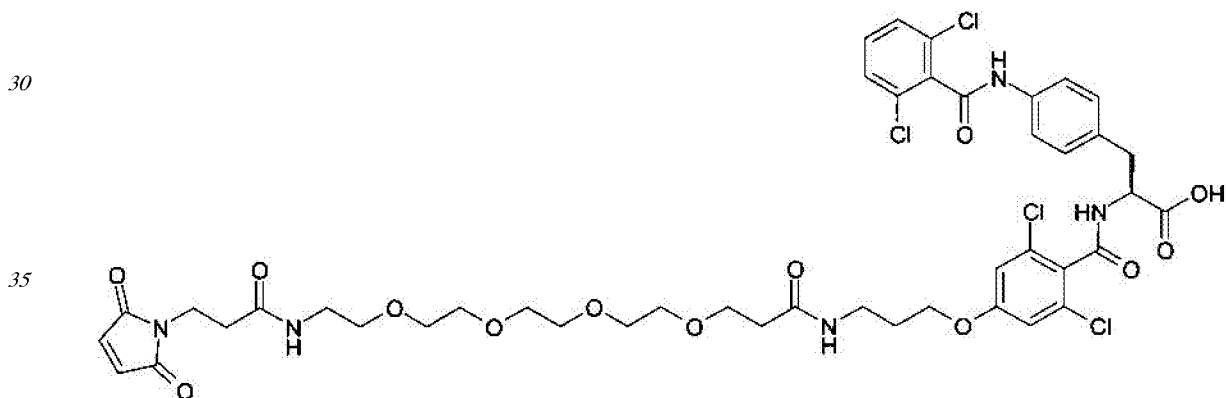
Стадия 7: получение (S)-2-[4-(3-аминопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты; VLA-4 Лиганд 2:



15 К раствору метилового эфира (S)-2-[4-(3-аминопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты (5,8 г; 7,98 ммоль,) в THF (200 мл) добавляли при комнатной температуре раствор гидроксида лития (2,4 г; 100 ммоль) в воде (30 мл). Эту смесь перемешивали в течение 15 ч при комнатной температуре, при этом анализ смеси с помощью ТСХ показал отсутствие исходного

20 вещества. Затем растворитель удаляли на роторном испарителе и остаток очищали с помощью ВЭЖХ с получением 3,7 г (выход 65%) (S)-2-[4-(3-аминопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоил-амино)фенил]пропионовой кислоты в виде белого твердого вещества. ES(+)-HRMS m/e расч. для C₂₆H₂₃Cl₄N₃O₅ (M+H)⁺ 598,0465; наблюд. 598,0465.

25 Стадия 8: получение (S)-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]-2-[2,6-дихлор-4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]-этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]пропокси]бензоиламино]пропионовой кислоты; VLA-4 Лиганд - Реагент 5:



40 Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 11, исходя из (S)-2-[4-(3-аминопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты (214 мг; 0,3 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 3-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)-пропиониламино]-этокси]этокси]этокси]этокси-пропионовой кислоты (154 мг; 0,3 ммоль) и DIPEA (388 мг; 522 мкл; 3,0 ммоль) и после очистки с помощью ВЭЖХ

45 получали белое твердое вещество (52 мг; 17%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₄₄H₄₉Cl₄N₅O₁₃ (M+Na)⁺ 1018,1973; наблюд. 1018,1965.

Пример 6

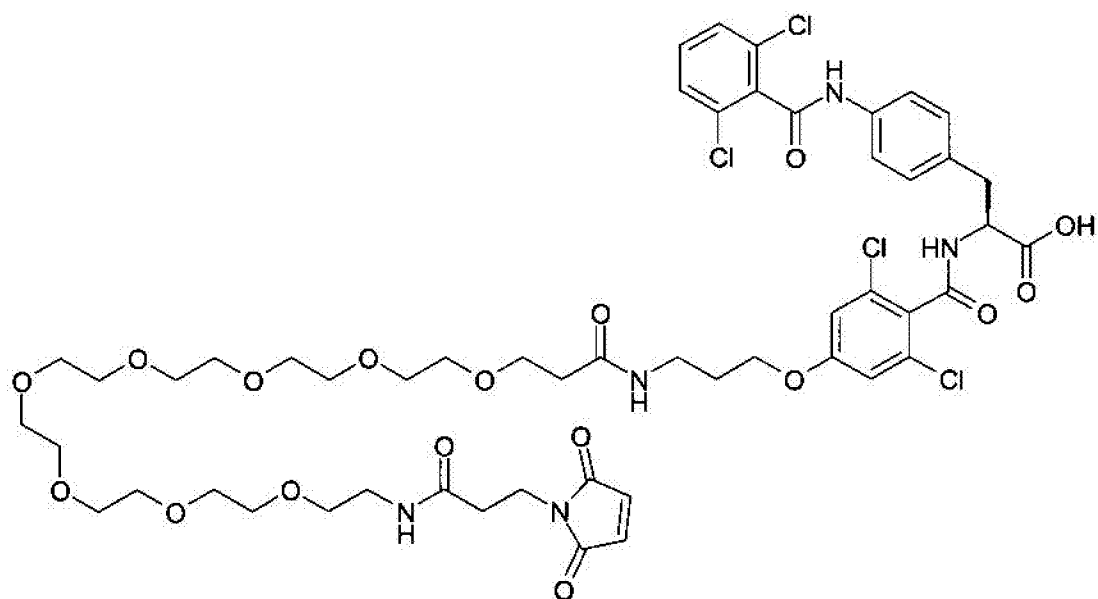
(S)-3-[4-(2,6-Дихлорбензоиламино)фенил]-2-[2,6-дихлор-4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-

[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]-этокси]этокси] этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]пропокси]-бензоиламино]пропионовая кислота; VLA-4 Лиганд - Реагент 6:

5

10

15



20

25

Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 11, исходя из (S)-2-[4-(3-аминопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты (107 мг; 0,15 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)-пропиониламино]этокси]этокси]этокси]-этокси]этокси]этокси]этокси]пропионовой кислоты (100 мг; 0,145 ммоль) и DIPEA (194 мг; 261 мкл; 1,5 ммоль), после очистки с помощью ВЭЖХ, с получением белого твердого вещества (50 мг; 28%). ES(+)-HRMS m/e расч. для $C_{52}H_{65}Cl_4N_5O_{17}$ (M+Na)⁺ 1194,3022; наблюд. 1194,3028.

30

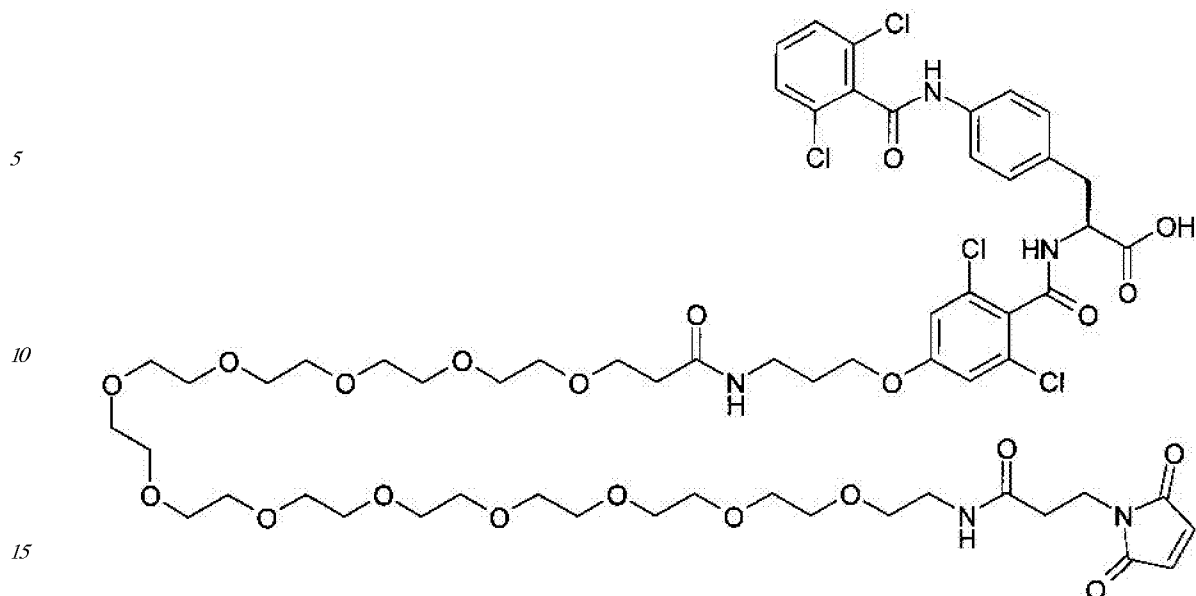
Пример 7

35

(S)-3-[4-(2,6-Дихлорбензоиламино)фенил]-2-[2,6-дихлор-4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]-этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]-пропокси]бензоиламино]пропионовая кислота; VLA-4 Лиганд - Реагент 7:

40

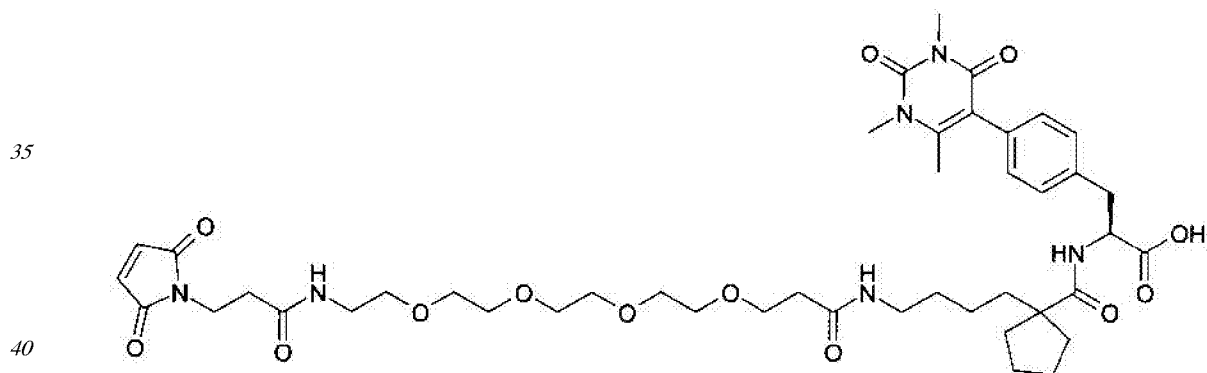
45



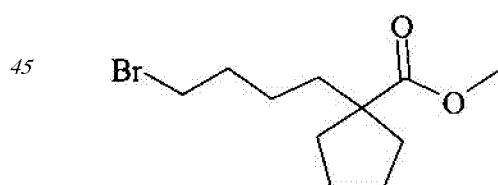
Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 11, исходя из (S)-2-[4-(3-аминопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(2,6-дихлорбензоиламино)фенил]пропионовой кислоты (143 мг; 0,2 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]-этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропионовой кислоты (173 мг; 0,2 ммоль) и DIPEA (258 мг; 348 мкл; 2,0 ммоль) и после очистки с помощью ВЭЖХ, с получением белого твердого вещества (45 мг; 16,6%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₆₀H₈₁Cl₄N₅O₂₁ (M+Na)⁺ 1370,4070; наблюд. 1370,4066.

Пример 8

(S)-2-[[1-[4-[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-Диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]бутил]циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионая кислота; VLA-4 Лиганд - Реагент 8:

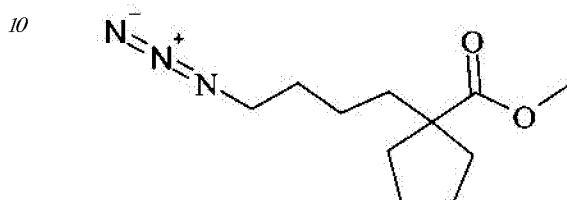


Стадия 1: получение метилового эфира 1-(4-бромбутил)циклопентанкарбоновой кислоты:



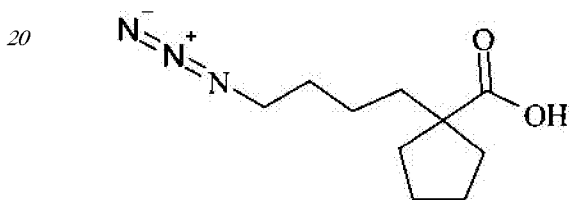
Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 1, исходя из диизопропиламина (21 мл; 150 ммоль), н-бутиллития (58 мл; 145 ммоль), метилового эфира циклопентанкарбоновой кислоты (13,1 г; 100 ммоль) и 1,4-дибромбутана (21,59 г; 100 ммоль) и после перегонки, с получением бесцветного масла (12,8 г; 48%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₁₁H₁₉BrO₂ (M+H)⁺ 262,0568; наблюд. 262,0565.

Стадия 2: получение метилового эфира 1-[4-азидобутил]циклопентанкарбоновой кислоты:



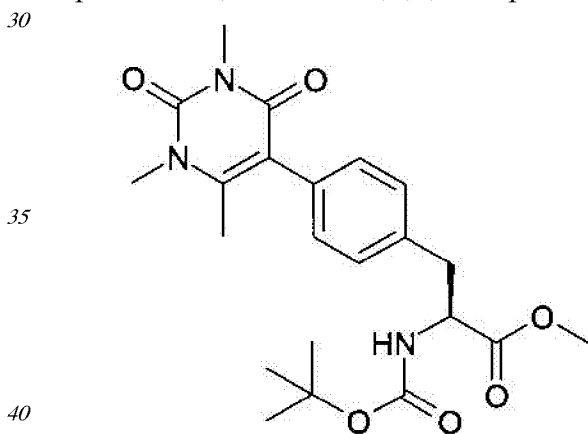
15 Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 2, исходя из метилового эфира 1-[4-бромбутил]-циклопентанкарбоновой кислоты и азиды натрия.

Стадия 3: получение 1-[4-азидобутил]циклопентанкарбоновой кислоты:



25 Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 3, исходя из метилового эфира 1-[4-азидобутил]-циклопентанкарбоновой кислоты и гидроксида лития.

Стадия 4: получение метилового эфира (S)-2-трет-бутоксикарбониламино-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты:



К суспензии цинковой пыли (52,29 г; 800 ммоль) в THF (26,0 мл) добавляли при комнатной температуре 1,2-дибромэтан (4,58 мл; 53,2 ммоль). Эту суспензию нагревали до 60-65°C с помощью тепловой пушки до прекращения выделения газообразного этилена (по наблюдению). Эту суспензию охлаждали до комнатной температуры, добавляли триметилхлорсилан (3,38 мл; 26,6 ммоль) и эту смесь перемешивали в течение 15 мин. Суспензию 5-иод-1,3,6-триметилурацила (74,6 г; 266 ммоль) в DMA (225 мл) нагревали с получением прозрачного раствора и добавляли его одной порцией к реакционной смеси. По окончании внесения эту смесь нагревали до 70°C. Внутренняя

температура реакционной смеси поднималась до 80-85°C из-за экзотермической реакции. Реакционную смесь перемешивали при 70°C в течение 3-4 ч, при этом ТСХ-анализ алиquotы реакционной смеси, погашенной насыщенным хлоридом аммония, показал отсутствие исходного вещества. Реакционную смесь разбавляли с помощью THF (140

5

мл), охлаждали до комнатной температуры и избыток цинковой пыли осаждали в течение 2-3 ч. Этот раствор, содержащий соединение цинка (266 ммоль), добавляли при комнатной температуре к раствору Pd(dba)₂ (4,6 г; 8 ммоль), три-о-толилфосфина [P(Tol)₃] (9,0 г; 29,6 ммоль) и метилового эфира (S)-2-трет-бутоксикарбониламино-3-(4-иод)фенил

10

пропионовой кислоты (75,56 г; 186 ммоль) в THF (280 мл), и полученную светло-желтую смесь перемешивали в течение 48 ч при 50-55°C. Реакционную смесь вливали в насыщенный раствор хлорида аммония и экстрагировали этилацетатом (3×750 мл). Объединенные экстракты промывали солевым раствором (1,5 л) и высушивали над безводным сульфатом магния. Осушитель

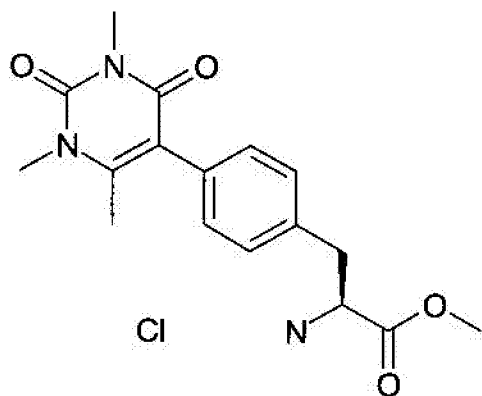
15

отфильтровывали и фильтрат концентрировали с получением неочищенного продукта, который очищали хроматографией на колонке с силикагелем, с использованием колонки Biotage (75 m), с получением 57,88 г (выход 72%) метилового эфира (S)-2-трет-бутоксикарбониламино-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты в виде аморфного белого твердого вещества. EI-

20

HRMS m/e расч. для C₂₂H₂₉N₃O₆ (M⁺) 431,2056, фактич. 431,2054. Стадия 5: получение метилового эфира (S)-2-амино-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты, гидрохлоридной соли:

25



30

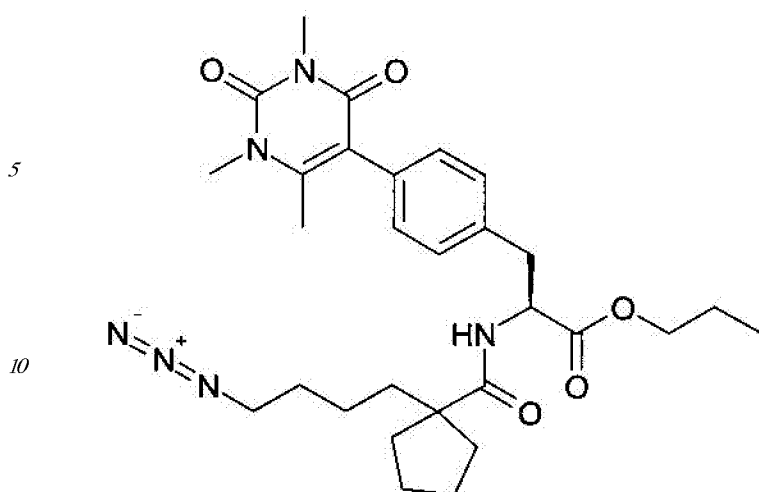
Часть твердого метилового эфира (S)-2-трет-бутоксикарбониламино-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты (7,4 г; 17,15 ммоль), полученного выше, обрабатывали при комнатной температуре 4 н хлороводородной кислотой в диоксане (17 мл; 68 ммоль) и этот раствор перемешивали в течение 1 ч, при этом образовывался белый осадок. Смесь разбавляли диэтиловым эфиром, супернатант декантировали и остаток высушивали сначала на роторном испарителе, а затем в высоком вакууме, с получением 6,28 г (выход 99%) метилового эфира (S)-2-амино-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты, гидрохлоридной соли, в виде аморфного желтого твердого вещества. FAB-HRMS m/e расч. для C₁₇H₂₁N₃O₄ (M+H) 332,1610, фактич. 332,1617.

35

40

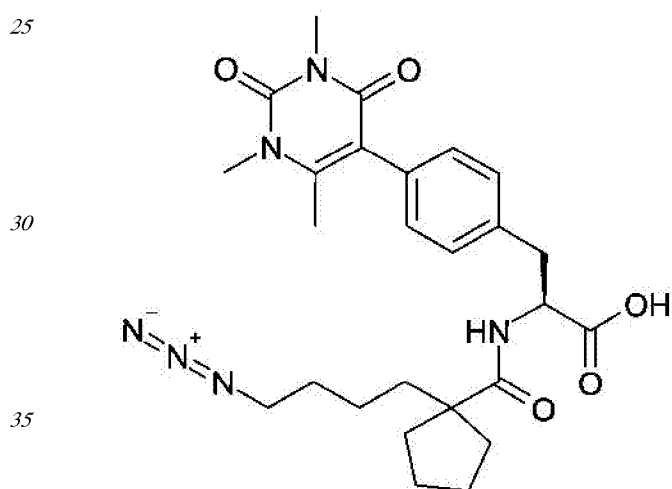
Стадия 6: получение пропилового эфира (S)-2-[[1-(4-азидобутил)циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты:

45



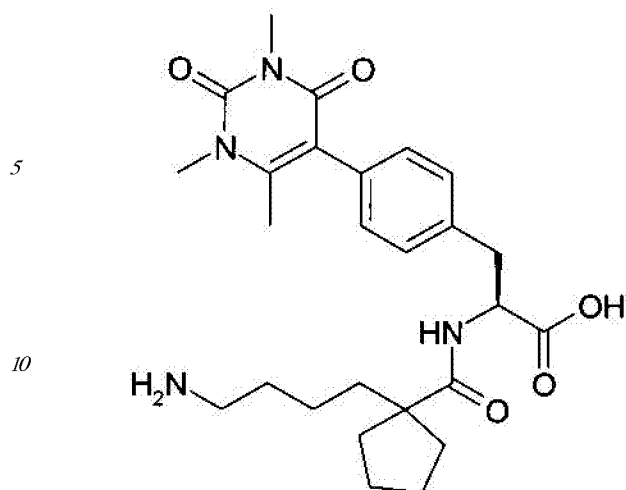
15 Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 8, исходя из пропилового эфира (S)-2-амино-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты (10,78 г; 30 ммоль), 1-[4-азидобутил]циклопентанкарбонической кислоты (8,24 г; 39 ммоль), HBTU (14,79 г; 39 ммоль) и DIPEA (11,63 г; 15,68 мл; 90 ммоль) и после очистки хроматографией на колонке ISCO, с получением аморфного грязно-белого твердого вещества (14,1 г; 85%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₂₉H₄₀N₆O₅ (M+H)⁺ 553,3133; наблюд. 553,3133.

20 Стадия 7: получение (S)-2-[[1-(4-азидобутил)циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты:



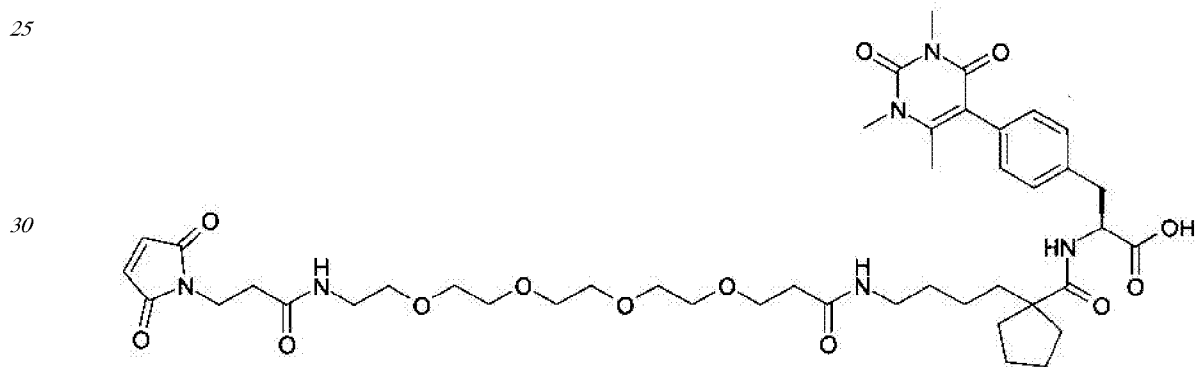
40 Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 9, исходя из пропилового эфира (S)-2-[[1-(4-азидобутил)циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты (4,1 г; 7,42 ммоль) и NaOH (35 мл; 35 ммоль; 1 M), с получением белого твердого вещества (3,75 г; 99%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₂₆H₃₄N₆O₅ (M+H)⁺ 511,2664; наблюд. 511,2664.

45 Стадия 8: получение (S)-2-[[1-(4-аминобутил)циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты; VLA-4 Лиганд 3:



15 Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 10, исходя из (S)-2-[[1-(4-азидобутил)-циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты (1,02 г; 2 ммоль) и триметилфосфина (8 мл; 8 ммоль; 1М), с получением белого твердого вещества (0,96 г; 99%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₂₆H₃₆N₄O₅ (M+H)⁺ 485,2759; наблюд. 485,2757.

20 Стадия 9: Получение (S)-2-[[1-[4-[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]бутил]циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты; VLA-4 Лиганд - Реагент 8:



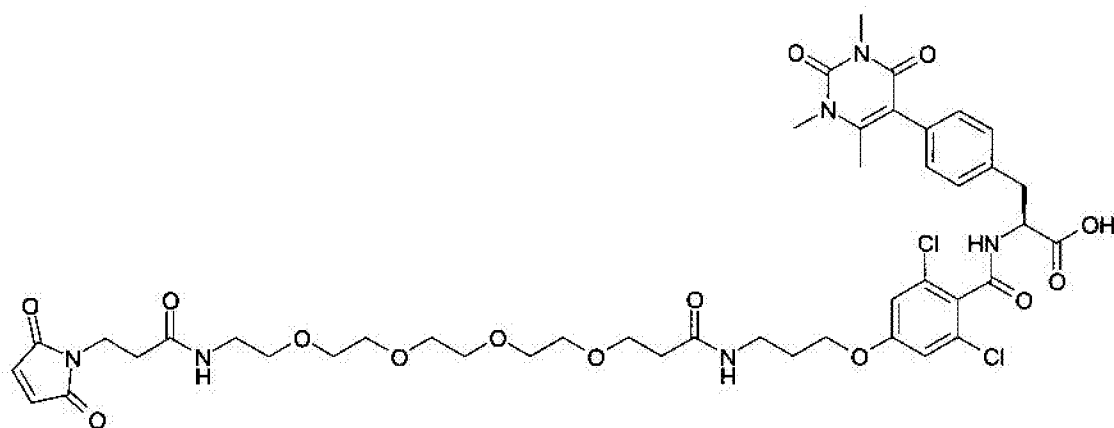
35 Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 11, исходя из (S)-2-[[1-(4-аминобутил)циклопентанкарбонил]амино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты (300 мг; 0,62 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 3-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)-пропиониламино]-этокси]этокси]этокси]этокси]пропионовой кислоты (318 мг; 0,62 ммоль) и DIPEA (160 мг; 215 мкл; 1,24 ммоль) и после очистки с помощью ВЭЖХ, с получением светло-желтого твердого вещества (274 мг; 50%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₄₄H₆₂N₆O₁₃ (M+H)⁺ 883,4448; наблюд. 883,4449.

Пример 9

45 (S)-2-[2,6-Дихлор-4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]пропокси]-бензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовая кислота; VLA-4 Лиганд - Реагент 9:

5

10

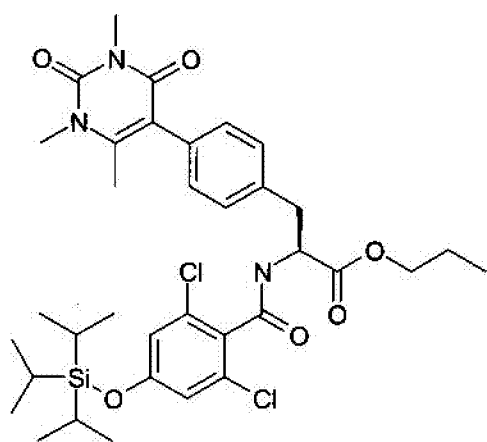


15

Стадия 1: получение пропилового эфира (S)-2-(2,6-дихлор-4-триизопропил-
силанилоксибензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-
5-ил)фенил]пропионовой кислоты

20

25



30

Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в
Примере 1, Стадия 8, исходя из пропилового эфира (S)-2-амино-3-[4-(1,3,6-триметил-
2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты (3,95 г; 11
ммоль), 2,6-дихлор-4-триизопропилсиланилоксибензойной кислоты (3,63 г; 10 ммоль),
НВТУ (5,42 г; 14,3 ммоль) и DIPEA (4,26 г; 5,75 мл; 33,0 ммоль) и после очистки
хроматографией на колонке ISCO, с получением аморфного белого твердого вещества
(1,7 г; 24%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₃₅H₄₇Cl₂N₃O₆Si (M+H)⁺ 704,2684; наблюд.

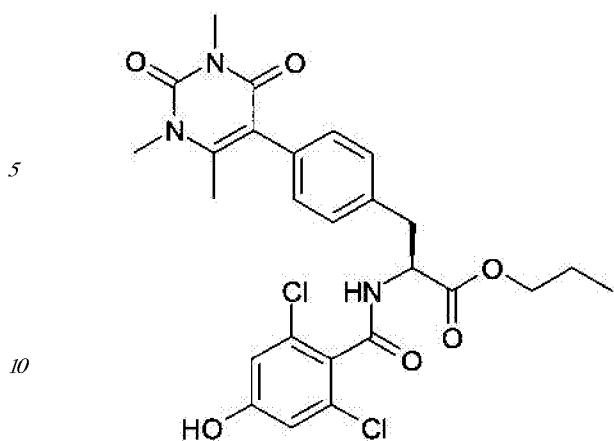
35

704,2683.

Стадия 2: получение пропилового эфира (S)-2-(2,6-дихлор-4-гидроксибензоиламино)-
3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-фенил]пропионовой
кислоты:

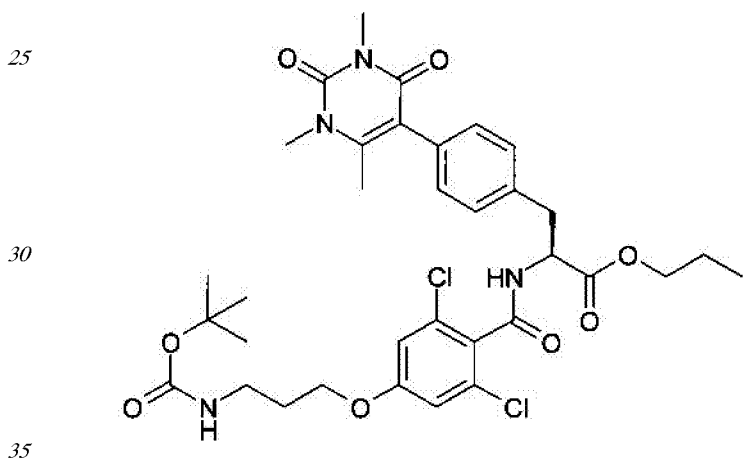
40

45



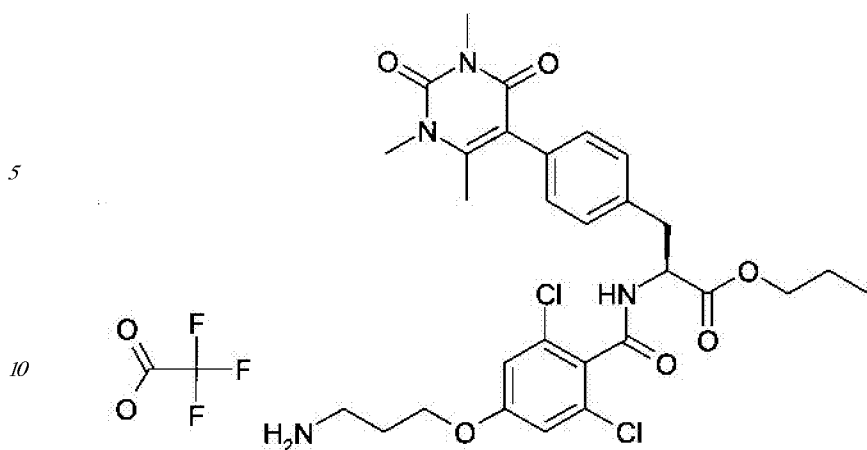
Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 5, Стадия 4, исходя из пропилового эфира (S)-2-(2,6-дихлор-4-
 15 триизопропилсиланилоксибензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты (1,66 г; 2,35 ммоль) и TBAF (3,5 мл; 3,5 ммоль; 1 М) и после очистки хроматографией на колонке ISCO, с получением белого твердого вещества (884 мг; 69%). ES(+)-LRMS m/e расч. для C₂₆H₂₇Cl₂N₃O₆ (M+
 20 H)⁺ 548; наблюд. 548.

Стадия 3: получение пропилового эфира (S)-2-[4-(3-трет-
 бутоксикарбониламинопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-
 диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты:



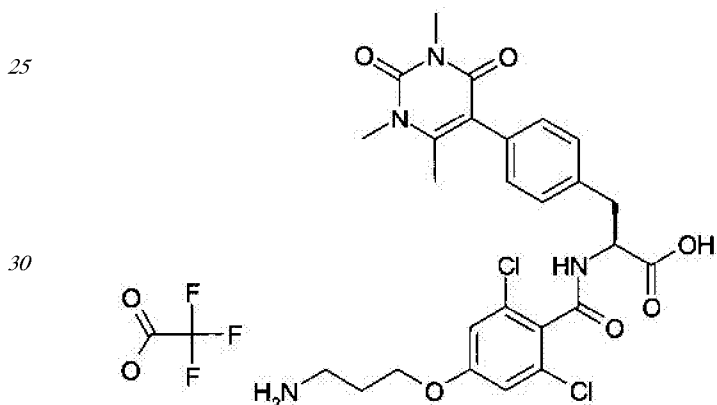
Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 5, Стадия 5, исходя из пропилового эфира (S)-2-(2,6-дихлор-4-
 гидроксibenзоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-
 5-ил)фенил]пропионовой кислоты (558 мг; 1,07 ммоль), 3-трет-
 40 бутоксикарбониламинопропилбромида (306 мг; 1,28 ммоль) и карбоната калия (445 мг; 3,22 ммоль) и после очистки хроматографией на колонке ISCO, с получением белого твердого вещества (654 мг; 87%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₃₄H₄₂Cl₂N₄O₈ (M+H)⁺ 705,2453; наблюд. 705,2451.

Стадия 4: получение пропилового эфира (S)-2-[4-(3-аминопропокси)-2,6-
 дихлорбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-
 ил)фенил]пропионовой кислоты, трифторацетатной соли:



Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 5, Стадия 6, исходя из пропилового эфира (S)-2-[4-(3-tert-
15 бутоксикарбониламинопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты (781 мг; 1,1 ммоль) и TFA (1,14 г; 742 мкл; 10 ммоль), с получением гигроскопичного белого твердого вещества (790 мг; 99%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₂₉H₃₄Cl₂N₄O₆ (M+H)⁺ 605,1928; наблюд. 605,1929.

20 Стадия 5: получение (S)-2-[4-(3-аминопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты, трифторацетатной соли:



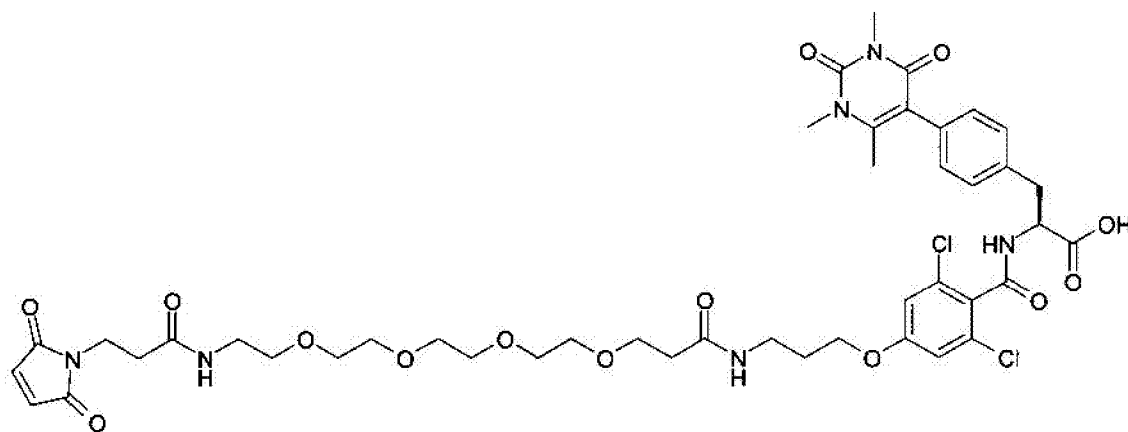
35 Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 5, Стадия 7, исходя из пропилового эфира (S)-2-[4-(3-аминопропокси)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты (852 мг; 1,1 ммоль) и LiOH (53 мг; 2,2 ммоль), с получением аморфного белого твердого вещества (740 мг; 99%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₂₆H₂₈Cl₂N₄O₆ (M+H)⁺ 563,1459; наблюд. 563,1455.

40 Стадия 6: получение (S)-2-[2,6-дихлор-4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино]пропокси]-бензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты; VLA-4 Лиганд - Реагент 9:

45

5

10



20

Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 11, исходя из (S)-2-[4-(3-аминопропоксид)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропиононовой кислоты, трифторацетатной соли, (203 мг; 0,3 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 3-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)-пропиониламино]-этокси]этокси]этокси]пропиононовой кислоты (154 мг; 0,3 ммоль) и DIPEA (194 мг; 261 мкл; 1,5 ммоль) и после очистки с помощью ВЭЖХ, с получением аморфного белого

твердого вещества (175 мг; 61%). ES(+)-HRMS m/e расч. для $C_{44}H_{54}Cl_2N_6O_{14}$ (M+H)⁺ 961,3148; наблюд. 961,3156.

Пример 10

25

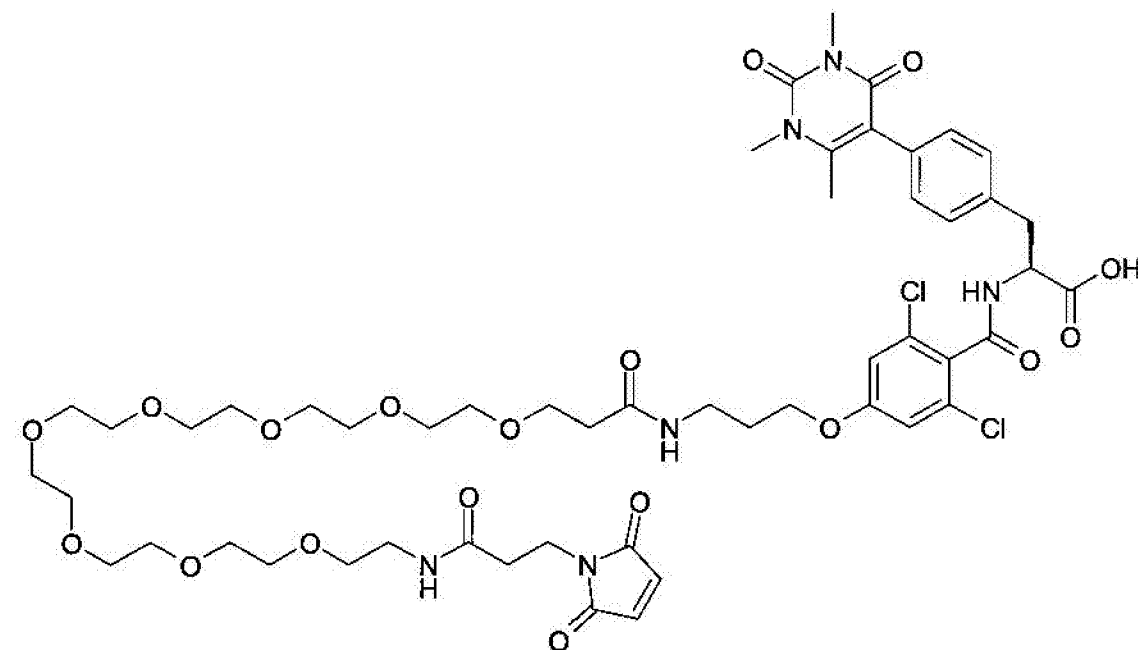
Получение (S)-2-[2,6-дихлор-4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]пропоксид]бензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропиононовой кислоты; VLA-4 Лиганд - Реагент 10:

30

35

40

45

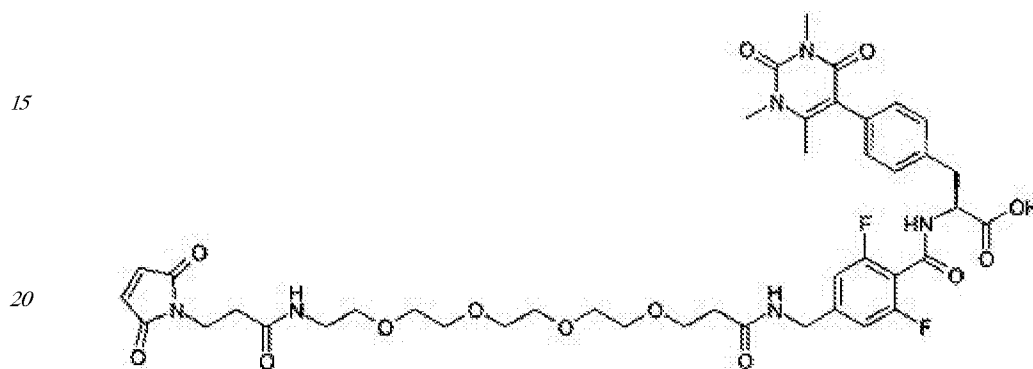


Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 11, исходя из (S)-2-[4-(3-аминопропоксид)-2,6-дихлорбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидро-пиримидин-5-ил)фенил]пропиононовой

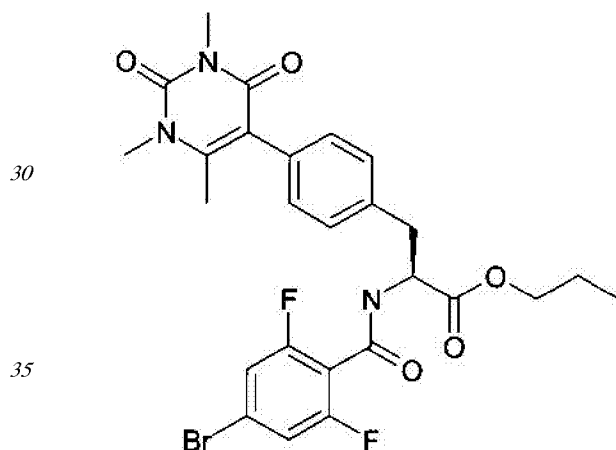
кислоты, трифторацетатной соли, (98 мг; 0,145 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)-пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]-этокси]этокси]этокси]этокси]пропионовой кислоты (100 мг; 0,145 ммоль) и DIPEA (187 мг; 252 мкл; 1,45 ммоль) и после очистки с помощью ВЭЖХ, с получением гигроскопического белого твердого вещества (88 мг; 53%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₅₂H₇₀Cl₂N₆O₁₈ (M+H)⁺ 1137,4197; наблюд. 1137,4196.

Пример 11

(S)-2-[4-[(3-[2-[2-[2-[2-[3-2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]пропиониламино)метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовая кислота, трифторацетатная соль; VLA-4 Лиганд - Реагент 11:

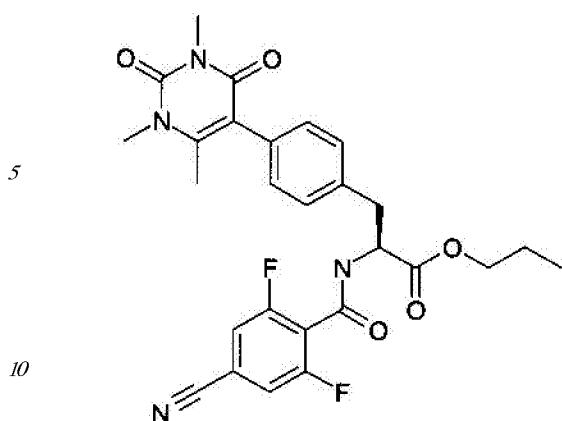


Стадия 1: получение пропилового эфира (S)-2-(4-бром-2,6-дифторбензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]-пропионовой кислоты:



Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 8, исходя из пропилового эфира (S)-2-амино-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты (4,67 г; 13 ммоль), 4-бром-2,6-дифторбензойной кислоты (3,12 г; 13,16 ммоль), HBTU (4,99 г; 13,16 ммоль) и DIPEA (6,8 мл; 39 ммоль) и после очистки хроматографией на колонке ISCO, с получением аморфного грязно-белого твердого вещества (6,71 г; 89%). ES-HRMS m/e расч. для C₂₆H₂₆BrF₂N₃O₅ (M+H)⁺ 578,1097, фактич. 578,1096.

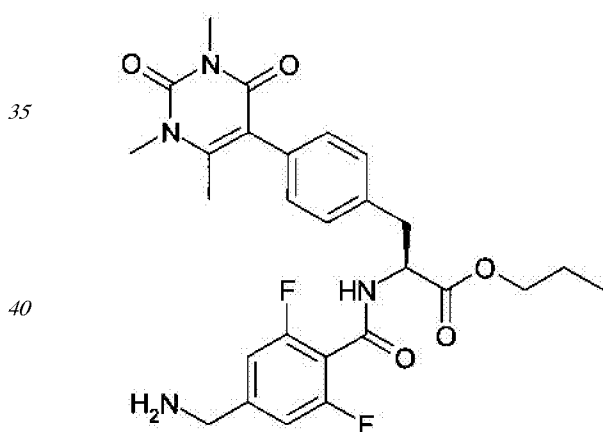
Стадия 2: получение пропилового эфира (S)-2-(4-циано-2,6-дифторбензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]-пропионовой кислоты:



К суспензии пропилового эфира (S)-2-(4-бром-2,6-дифторбензоиламино)-3-[4-(1,3,6-
 триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]-пропионовой кислоты
 (5,78 г; 10 ммоль) добавляли при комнатной температуре цианид цинка (940 мг; 8 ммоль)
 15 и тетракис(трифенилфосфин)палладий (1,16 г; 1 ммоль) в DMF (40 мл; перегнанный и
 дегазированный). Полученный раствор нагревали до 85°C и перемешивали в течение
 24 ч, при этом анализ смеси с помощью ТСХ показал отсутствие исходного вещества.
 Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и вливали ее в воду
 (100 мл) с получением мутной суспензии.

20 Далее полученное органическое вещество экстрагировали этилацетатом (2×100 мл).
 Объединенные экстракты промывали солевым раствором (100 мл) и высушивали над
 безводным сульфатом магния. Осушитель отфильтровывали и концентрировали
 растворитель с получением неочищенного продукта, который очищали хроматографией
 на колонке ISCO (150 г) с получением 5,2 г (выход 99%) пропилового эфира (S)-2-(4-
 25 циано-2,6-дифторбензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-
 тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты в виде аморфного белого
 твердого вещества. ES-HRMS m/e расч. для C₂₇H₂₆F₂N₄O₅ (M+H)⁺ 525,1944, фактич.
 525,1942.

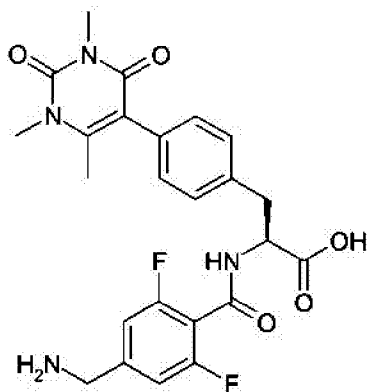
30 Стадия 3: получение пропилового эфира (S)-2-(4-аминометил-2,6-
 дифторбензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-
 ил)фенил]пропионовой кислоты:



К раствору борогидрида натрия (0,29 г; 7,62 ммоль; 2 экв.) в THF (5 мл) добавляли
 45 TFA (566 мкл; 7,62 ммоль; 2 экв.), реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин
 и затем добавляли по каплям раствор пропилового эфира (S)-2-(4-аминометил-2,6-дифтор-
 бензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-
 фенил]-пропионовой кислоты (2,0 г; 3,81 ммоль) в THF (6 мл) (колбу предварительно

промывали с помощью THF (2×1 мл)). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение 1,3 ч. Реакционную смесь охлаждали на ледяной бане и гасили водой (20 мл) и раствором хлорида натрия (20 мл воды, 100 мл насыщенного раствора). Водную смесь экстрагировали с помощью DCM (2×200 мл) и затем органические слои промывали солевым раствором, объединяли и высушивали над сульфатом магния и затем концентрировали с получением грязно-белого твердого вещества, 1,77 г. Неочищенный продукт суспендировали в изопропилацетате (75 мл) и добавляли по каплям изопропиловый спирт (0,75 мл) и TMSCl (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч и полученный белый осадок фильтровали и промывали изопропилацетатом и гексаном с получением 1,5 г (выход 63%) пропилового эфира (S)-2-(4-аминометил-2,6-дифторбензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты в виде аморфного белого твердого вещества. ES-HRMS m/e расч. для $C_{27}H_{30}F_2N_4O_5$ (M+H)⁺ 529,2257, фактич. 529,2258.

Стадия 4: получение (S)-2-(4-аминометил-2,6-дифторбензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты, трифторацетатной соли; VLA-4 Лиганд 4:

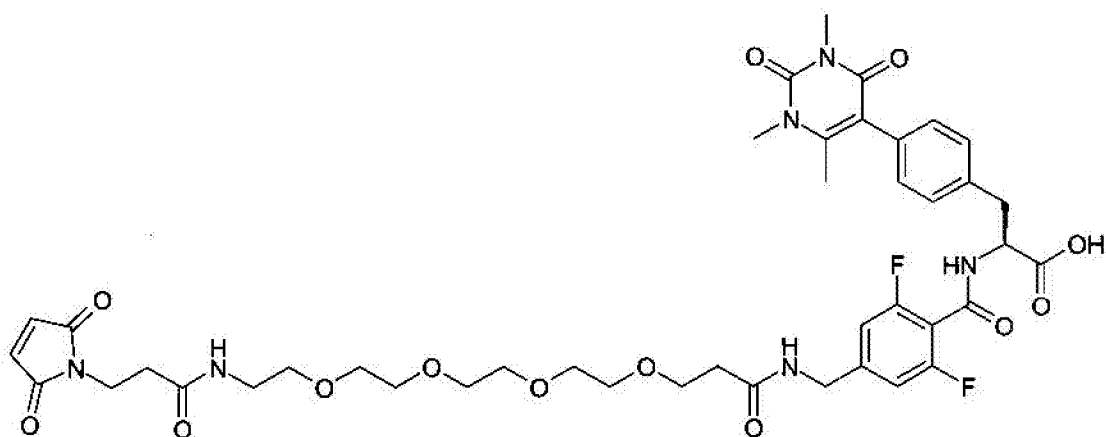


К суспензии пропилового эфира (S)-2-(4-аминометил-2,6-дифторбензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]-пропионовой кислоты (508 мг; 0,96 ммоль) в THF (10 мл) добавляли раствор гидроксида лития (240 мг; 10 ммоль) в воде (2 мл) при комнатной температуре. Эту смесь перемешивали в течение 15 ч, при этом анализ с помощью ТСХ показал отсутствие исходного вещества. Затем THF удаляли при пониженном давлении, остаток разбавляли водой (100 мл) и эту смесь подкисляли с помощью TFA. Неочищенный продукт очищали путем ВЭЖХ с получением 450 мг (выход 78%) (S)-2-(4-аминометил-2,6-дифторбензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты в форме соли TFA, в виде белого твердого вещества. ES-LRMS m/e расч. для $C_{24}H_{24}F_2N_4O_5$ (M+H)⁺ 487, фактич. 487.

Стадия 5: получение (S)-2-[4-[(3-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)-пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино)метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-фенил]пропионовой кислоты:

5

10



15

20

Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 11, исходя из (S)-2-(4-аминометил-2,6-дифторбензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-фенил]пропионо-

кислоты, TFA соли (120 мг; 0,2 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)-пропиониламино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропионо-

кислоты (103 мг; 0,2 ммоль) и DIPEA (129 мг; 174 мкл; 1,0 ммоль) и после очистки с помощью ВЭЖХ, с получением белого твердого вещества (75 мг; 43%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₄₂H₅₀F₂N₆O₁₃ (M+Na)⁺ 907,3296; наблюд. 907,3296.

Пример 12

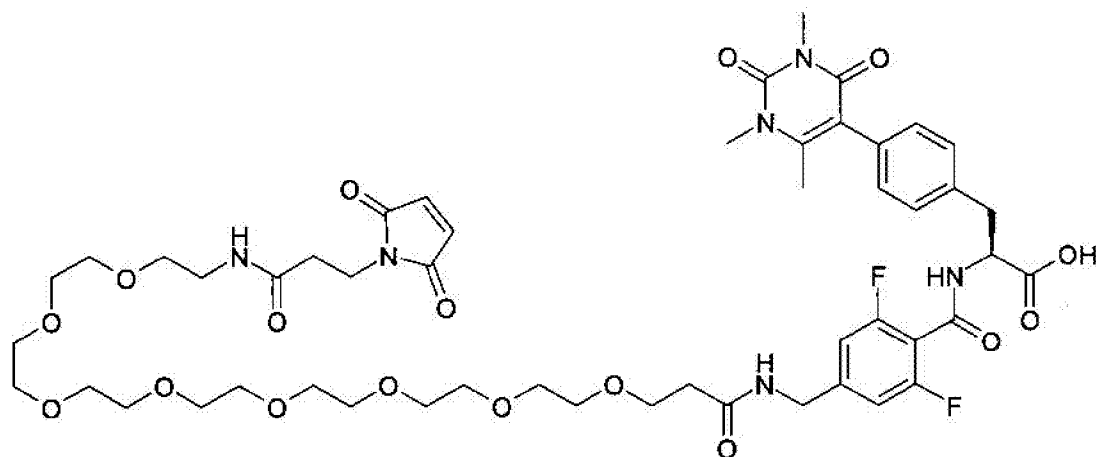
25

Получение (S)-2-[4-[(3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]-пропиониламино)метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионо-

кислоты, трифторацетатной соли; VLA-4 Лиганд - Реагент 12:

30

35



40

45

Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, Стадия 11, исходя из (S)-2-(4-аминометил-2,6-дифторбензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионо-

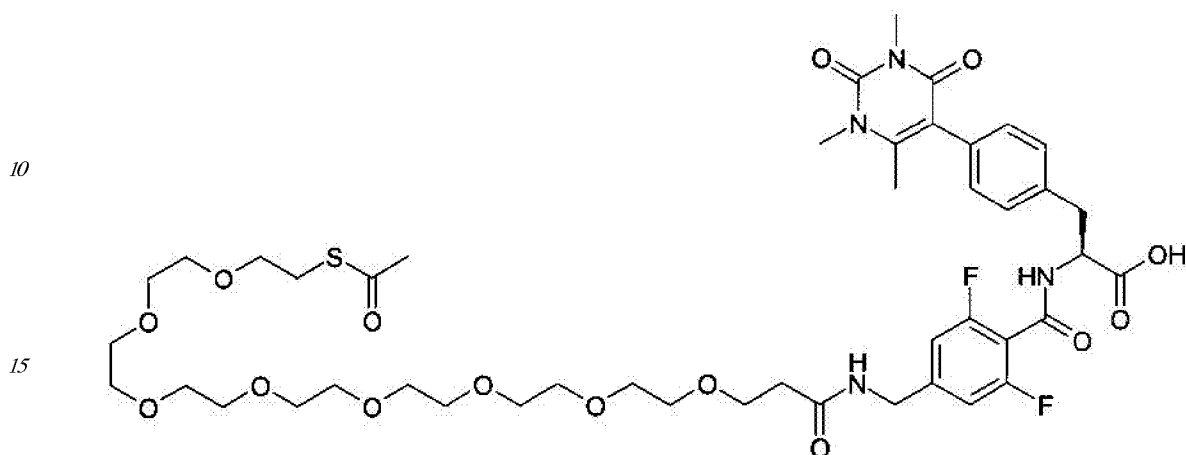
кислоты, TFA-соли (121 мг; 0,2 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)-пропиониламино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]-этоксид]этоксид]пропионо-

кислоты (100 мг; 0,145 ммоль) и DIPEA (258 мг; 348 мкл; 2,0 ммоль) и после очистки с помощью ВЭЖХ, с получением белого твердого вещества (80 мг; 38%). ES(+)-HRMS m/e расч. для C₅₀H₆₆F₂N₆O₁₇ (M+H)⁺ 1061,4526; наблюд. 1061,4521.

Пример 13

Получение (S)-2-[4-[[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-ацетилсульфанил-этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]-пропионовой

5



10

15

Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, стадия 11, исходя из (S)-2-(4-аминометил-2,6-дифторбензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой

20

25

Пример 14

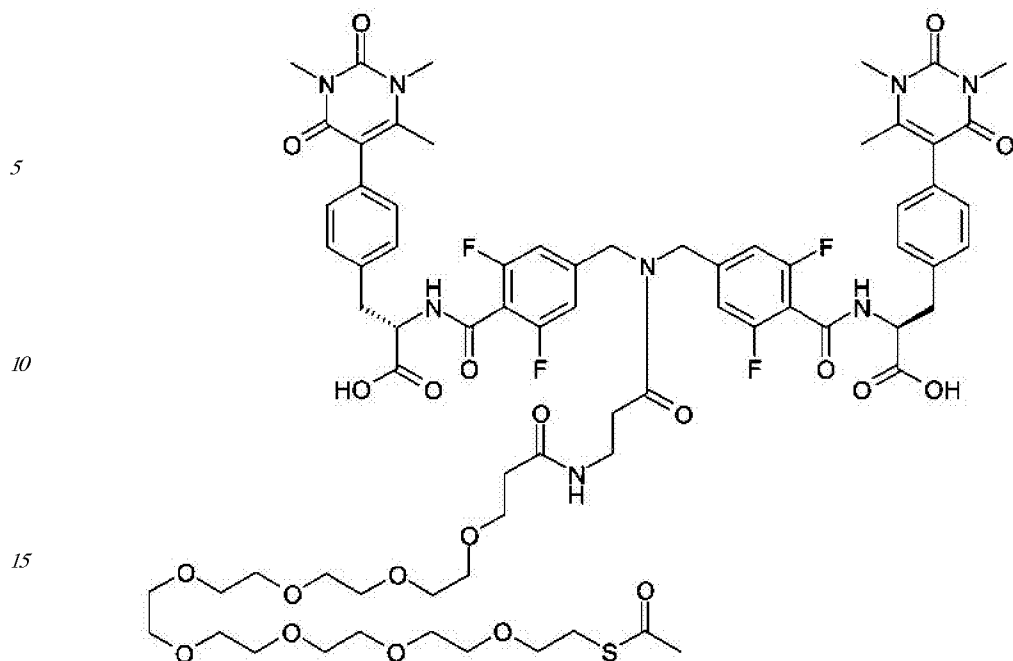
Получение (S)-2-[4-[[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-ацетилсульфанилэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]пропионил]-[4-[(S)-1-карбокси-2-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]-этилкарбамоил]-3,5-дифторбензиламино]метил]-2,6-дифторбензиламино]-3-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]пропионовой кислоты;

30

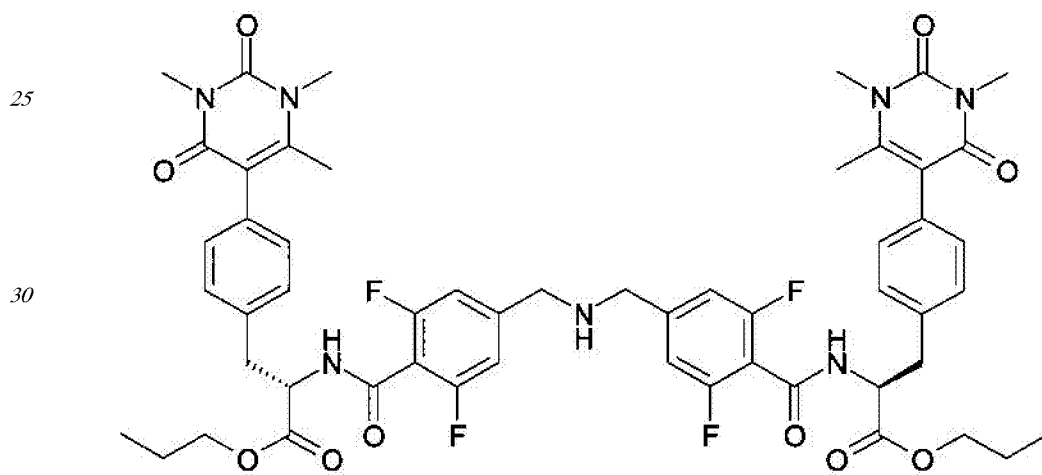
35

40

45



20 Стадия 1: получение пропилового эфира (S)-2-[4-[[3,5-дифтор-4-[(S)-1-пропоксикарбонил-2-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]этилкарбамоил]бензиламино]метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]пропионовой кислоты:

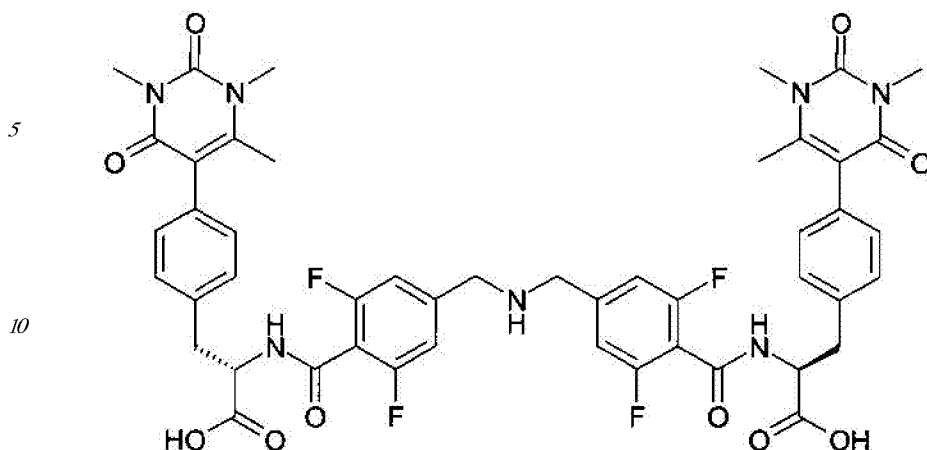


40 В колбу на 100 мл с пропиловым эфиром (S)-2-(4-циано-2,6-дифторбензоиламино)-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовой кислоты (524 мг; 1,0 ммоль), растворенным в н-пропанол (20 мл), через который пропускали азот, вносили палладий на угле (10%, 106 мг). Реакционный сосуд герметизировали, трижды дегазировали, пропуская азот и создавая вакуум, и затем выдерживали в атмосфере водорода из баллона в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли с помощью EA, снова дегазировали и выдерживали в атмосфере водорода в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали через Celite, концентрировали и очищали в ходе ВЭЖХ с получением указанного в заголовке соединения (204 мг; 19%).

45 ES(+)-LRMS m/e расч. для C₅₄H₅₇F₄N₇O₁₀ (M+H)⁺ 1041, набл. 1041.

Стадия 2: получение (S)-2-[4-[[3,5-дифтор-4-[(S)-1-карбокси-2-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]этилкарбамоил]бензиламино]-метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-

5-ил]фенил]пропионовой кислоты:

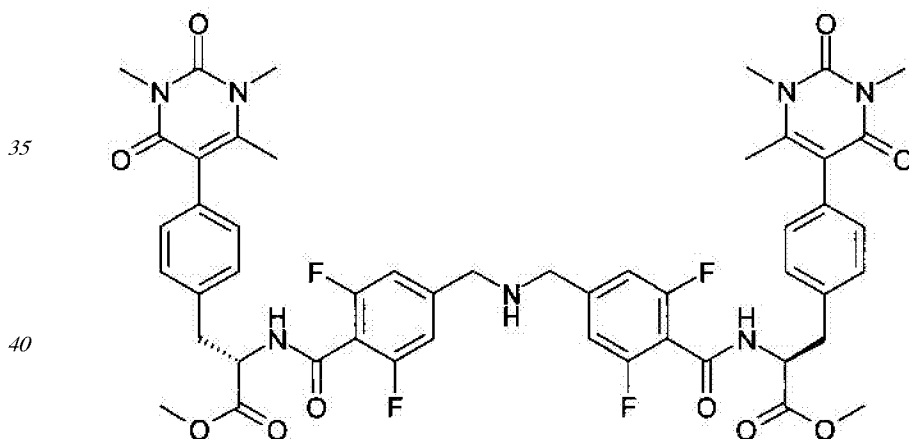


15 В колбу на 200 мл с пропиловым эфиром (S)-2-[4-[[3,5-дифтор-4-[(S)-1-пропоксикарбонил-2-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]этилкарбамоил]бензиламино]метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]пропионовой кислоты (1004 мг, 0,97 ммоль) вносили THF (25 мл), воду (25 мл) и LiOH (193 мг; 4,6 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи.

20 Реакционную смесь концентрировали, высушивали из ацетонитрила с получением белого твердого вещества, которое смешивали с DMSO (13 мл) и водой (12 мл). Эту смесь минимально нагревали, фильтровали, и к полученному фильтрату добавляли TFA (0,25 мл), с образованием осадка. Этот осадок разводили водой (50 мл), фильтровали, промывали водой и гексаном и высушивали в высоком вакууме с

25 получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (696 мг; 75%). ES(+)-LRMS m/e расч. для C₄₈H₄₅F₄N₇O₁₀ (M+H)⁺ 956, набл. 956.

30 Стадия 3: получение метилового эфира (S)-2-[4-[[3,5-дифтор-4-[(S)-1-метоксикарбонил-2-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]-фенил]этилкарбамоил]бензиламино]метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]пропионовой кислоты:

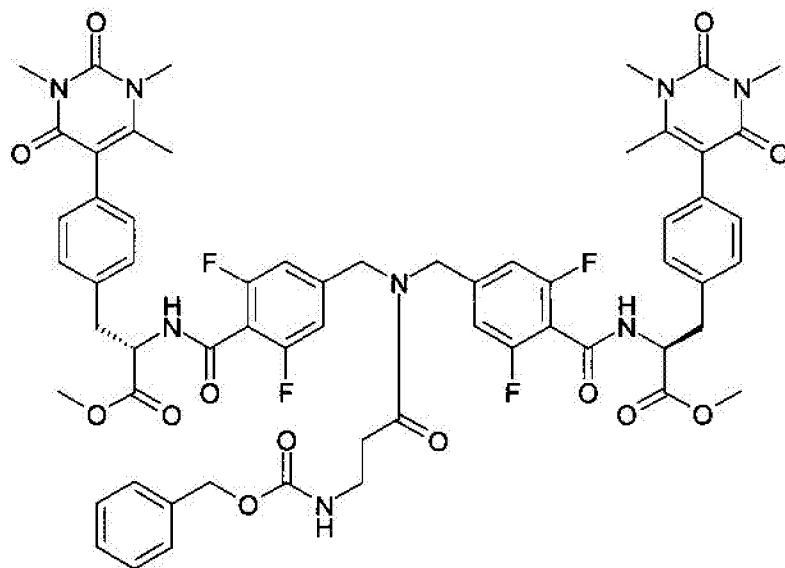


45 В колбу с (S)-2-[4-[[3,5-дифтор-4-[(S)-1-карбоксо-2-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]этилкарбамоил]бензиламино]-метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]пропионовой кислотой (560 мг; 0,59 ммоль) вносили метанол (50 мл) и TMSCl (398 мг; 460 ммоль; 3,66 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли с помощью EA (10 мл), DCM (140 мл) и промывали

водным раствором NaHCO_3 (вода: насыщенный раствор 50 мл: 50 мл; 10 мл солевого раствора) и солевым раствором (100 мл). Органические слои высушивали над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества, которое непосредственно использовали в таком виде.

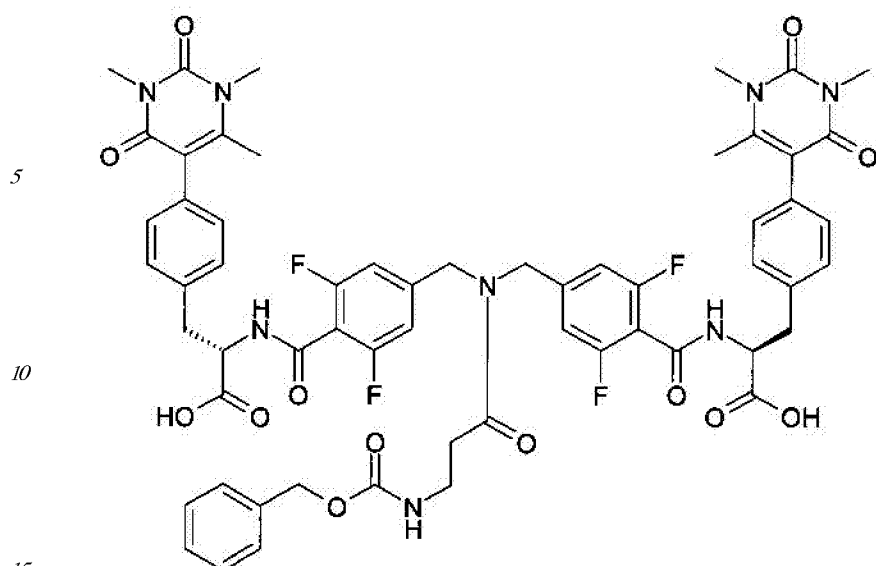
ES(+)-LRMS m/e расч. для $\text{C}_{50}\text{H}_{49}\text{F}_4\text{N}_7\text{O}_{10}$ (M+H)⁺ 984, набл. 984.

Стадия 4: получение метилового эфира (S)-2-[4-[[3-бензилоксикарбониламинопропионил]-3,5-дифтор-4-[(S)-1-метоксикарбонил-2-[4-[[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]этилкарбамоил]бензиламино]-метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-((1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил)пропионовой кислоты:



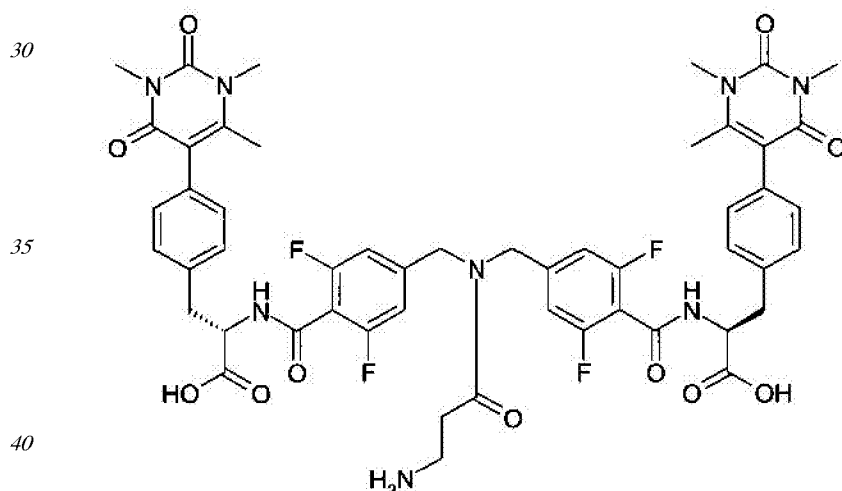
В колбу с CBZ-бета-аланином (123 мг; 0,55 ммоль) и DCM (1 мл) вносили по каплям оксалилхлорид (710 мг; 0,488 ммоль; 5,5 ммоль), растворенный в DCM (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 ч и затем концентрировали до твердого остатка. Это твердое вещество ресуспендировали в DCM (1 мл) и добавляли по каплям или порциями к раствору метилового эфира (S)-2-[4-[[3,5-дифтор-4-[(S)-1-метоксикарбонил-2-[4-[[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]этилкарбамоил]-бензиламино]метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-[[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]пропионовой кислоты (0,59 ммоль) в DMF (5 мл) и DIPEA (131 мг; 0,178 ммоль; 1,0 ммоль) с дополнительной промывкой с помощью DCM (2×0,4 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение выходных. Реакционную смесь разбавляли с помощью EA (200 мл), промывали водным раствором NaHCO_3 (вода : насыщенный раствор 100 мл : 100 мл) и солевым раствором (100 мл), высушивали над MgSO_4 , фильтровали, концентрировали и очищали флэш-хроматографией с возрастающей концентрацией MeOH/DCM в DCM от 10% до 30%. Указанное в заголовке соединение выделяли в виде белого твердого вещества (400 мг; 67%). ES(+)-LRMS m/e расч. для $\text{C}_{61}\text{H}_{60}\text{F}_4\text{N}_8\text{O}_{13}$ (M+H)⁺ 1189, набл. 1189.

Стадия 5: получение (S)-2-[4-[[3-бензилоксикарбониламинопропионил]-3,5-дифтор-4-[(S)-1-карбокси-2-[4-[[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]этилкарбамоил]бензиламино]метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-((1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил)пропионовой кислоты:



Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 5, Стадия 7, исходя из метилового эфира (S)-2-[4-[[3-бензилоксикарбониламинопропионил]-3,5-дифтор-4-[(S)-1-метоксикарбонил-2-[4-[[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]этилкарбамоил]бензиламино]метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-((1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил)пропионовой кислоты (380 мг; 0,32 ммоль), THF (8 мл), воды (8 мл), LiOH (51 мг; 1,21 ммоль) и 1 н HCl, после осаждения, растворения и концентрирования, с получением белого твердого вещества (325 мг). ES(+)-LRMS m/e расч. для C₅₉H₅₆F₄N₈O₁₃ (M+H)⁺ 1161, набл. 1161.

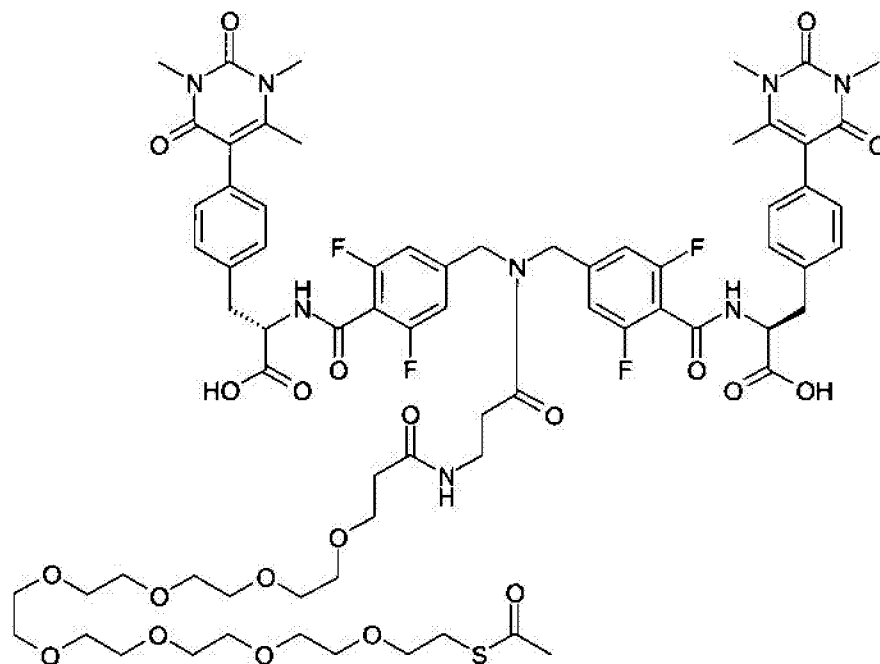
Стадия 6: получение (S)-2-[4-[[3-аминопропионил]-3,5-дифтор-4-[(S)-1-карбоксии-2-[4-[[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]этилкарбамоил]бензиламино]метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-((1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил)пропионовой кислоты; VLA-4 Лиганд 6:



Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 14, Стадия 1, исходя из (S)-2-[4-[[3-бензилоксикарбониламинопропионил]-3,5-дифтор-4-[(S)-1-карбоксии-2-[4-[[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]этилкарбамоил]бензиламино]метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-((1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил)пропионовой кислоты (313 мг; 0,27 ммоль), палладия на угле (10%) и водорода при давлении 1 атм. Указанное в заголовке соединение получали после четырех циклов обработки (3×65 мг; 0,061

ммоль; комнатная температура, 3 ч, 4 ч, 18 ч; и 205 мг; 0,19 ммоль; 40°C 4,5 ч) и фильтрации, в виде грязно-белого твердого вещества (79 мг; 28%). ES(+)-LRMS m/e расч. для C₅₁H₅₀F₄N₈O₁₁ (M+H)⁺ 1027, набл. 1027.

Стадия 7: получение (S)-2-[4-[[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-ацетилсульфанилэтоксид)этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино]пропионил]-4-[(S)-1-карбокси-2-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]этилкарбамоил]-3,5-дифторбензиламино]метил]-2,6-дифторбензиламино]-3-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]-пропионовой кислоты:



Указанное в заголовке соединение получали таким же способом, как описано в Примере 1, стадия 11 исходя из (S)-2-[4-[[3-аминопропионил]-3,5-дифтор-4-[(S)-1-карбокси-2-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]этилкарбамоил]бензиламино]метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-((1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил)пропионовой кислоты (84,3 мг; 0,082 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-илового эфира 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-ацетилсульфанилэтоксид)этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропионовой кислоты (49,1 мг; 0,082 ммоль) и DIPEA (31 мг; 43 мкл, 0,246 ммоль) и после очистки с помощью ВЭЖХ, с получением белого твердого вещества (57 мг; 46%). ES(+)-LRMS m/e расч. для C₇₂H₈₈F₄N₈O₂₁S₁ (M/2+H)⁺ 755, набл. 755.

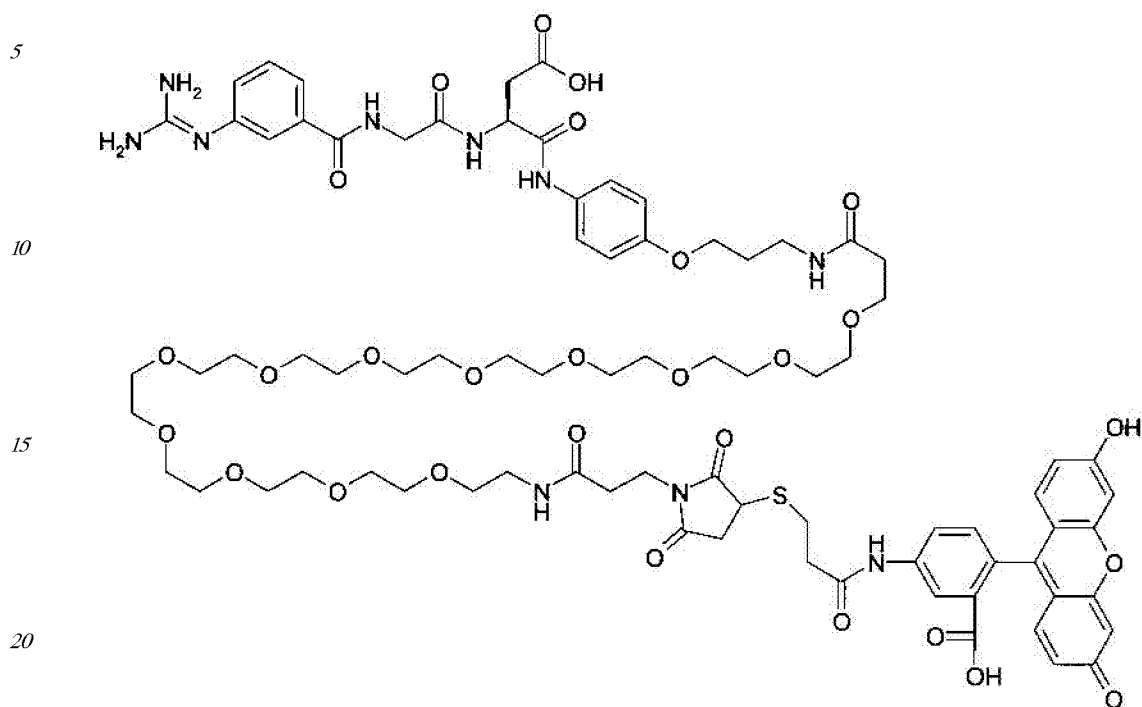
Получение меченных флуоресцеином (FITC) специфических реагентов

Специфические реагенты можно дериватизировать флуорофорами, которые могут быть полезны в исследованиях по отслеживанию их связывания с клетками, которые экспрессируют рецепторы к специфическим низкомолекулярным соединениям. Такие молекулы можно изготавливать любым из двух способов. Во-первых, можно провести реакцию нацеленных малеимидов с 2-[(5-флуоресцеинил)аминокарбонил]этилмеркаптаном. Как вариант, можно провести реакцию в одном реакционном сосуде нацеливающих низкомолекулярных лигандов - антагонистов интегрина с 2-[(5-флуоресцеинил)аминокарбонил]-этилмеркаптаном и бифункциональным ПЭГ-реагентом, как показано на схемах 17 и 18.

Пример по Способу а)

Получение полуамида (S)-N-[4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-

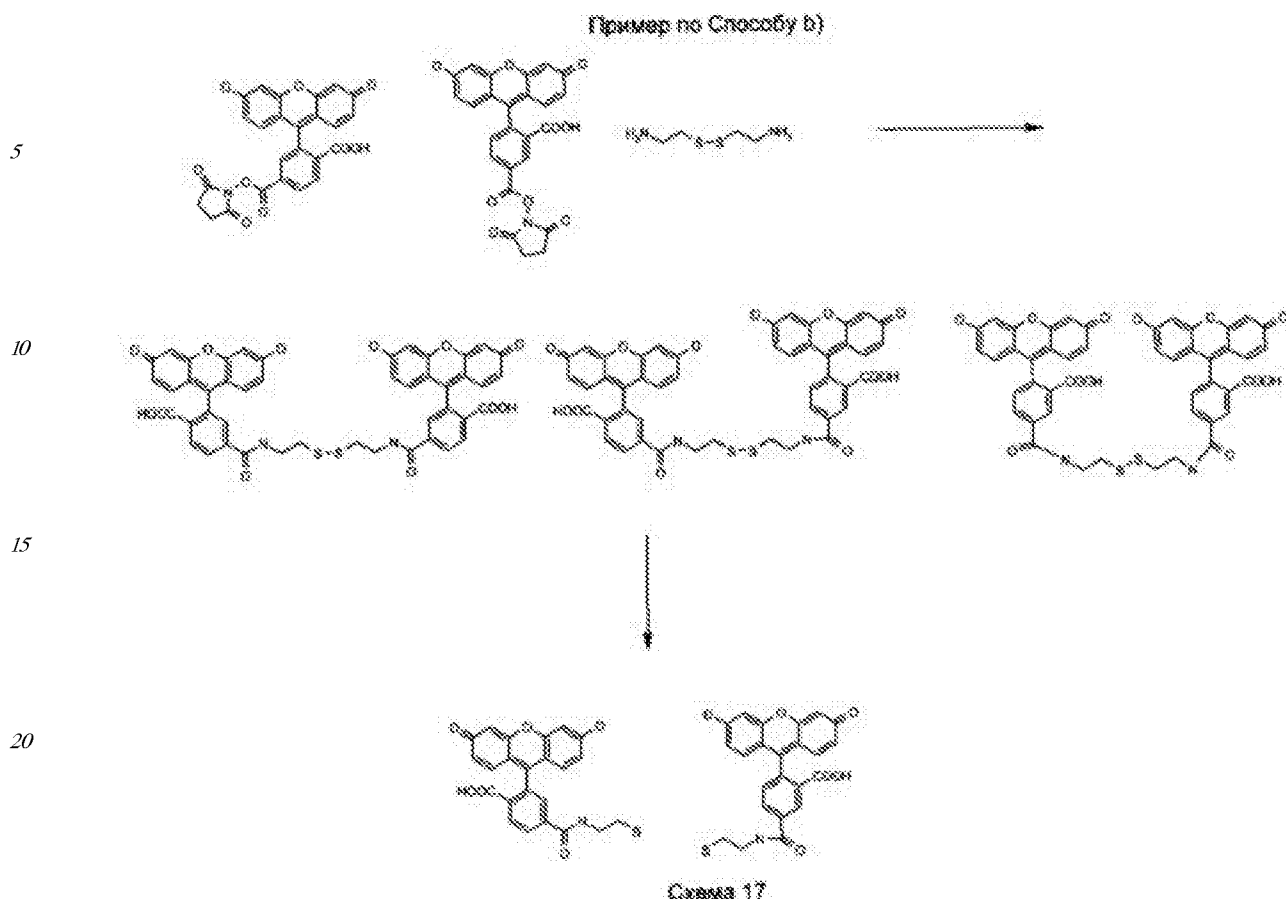
2,5-дигидропиррол-1-ил)-пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]-этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]-пропиониламино]пропокси]-фенил]-3-[2-[3-(3-(гуанидино)-бензоиламино]-ацетиламино]-янтарной кислоты-FITC



К желтой суспензии полуамида (S)-N-[4-[3-[3-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)-пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]-пропокси]фенил]-3-[2-[3-(3-(гуанидино)-бензоиламино]-ацетиламино]-янтарной кислоты (37,5 мг; 0,03 ммоль) и 2-[(5-флюоресцеинил)аминокарбонил]-этилмераптана (FITC-реагент) (15,6 мг; 0,036 мл) в метаноле (5 мл) добавляли при комнатной температуре, в атмосфере азота избыток DIPEA (38,7 мг; 52 мкл; 0,3 ммоль). Полученную светло-желтую суспензию перемешивали в течение 2 ч, при этом анализ с помощью LCMS показал отсутствие исходного вещества. Затем избыток DIPEA удаляли в вакууме и выделяли желаемый продукт после проведения очистки с помощью ВЭЖХ, с получением 25 мг (выход 50%) FITC-производного полуамида (S)-N-[4-[3-[3-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропиониламино]пропокси]-фенил]-3-[2-[3-(3-(гуанидино)-бензоиламино]-ацетиламино]-янтарной кислоты в виде коричневого твердого вещества.

ES(+)-HRMS m/e расч. для $C_{80}H_{104}N_{10}O_{28}S (M+2H)^{2+}$ 843,3444; наблюд. 843,3437.

Данные LCMS = M+H, 1687,6



25 Стадия 1. Цистамин дигидрохлорид (68 мг; 0,301 ммоль) и DIEA (110 мкл; 2,1 экв.) растворяли в DMF (10 мл), после чего добавляли NHS-флуоресцеин, смесь 5- и 6-карбоксихлоресцеина (300 мг; 0,634 ммоль) и полученную реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем ее разводили этилацетатом и промывали три раза водой и один раз солевым раствором. Экстракт

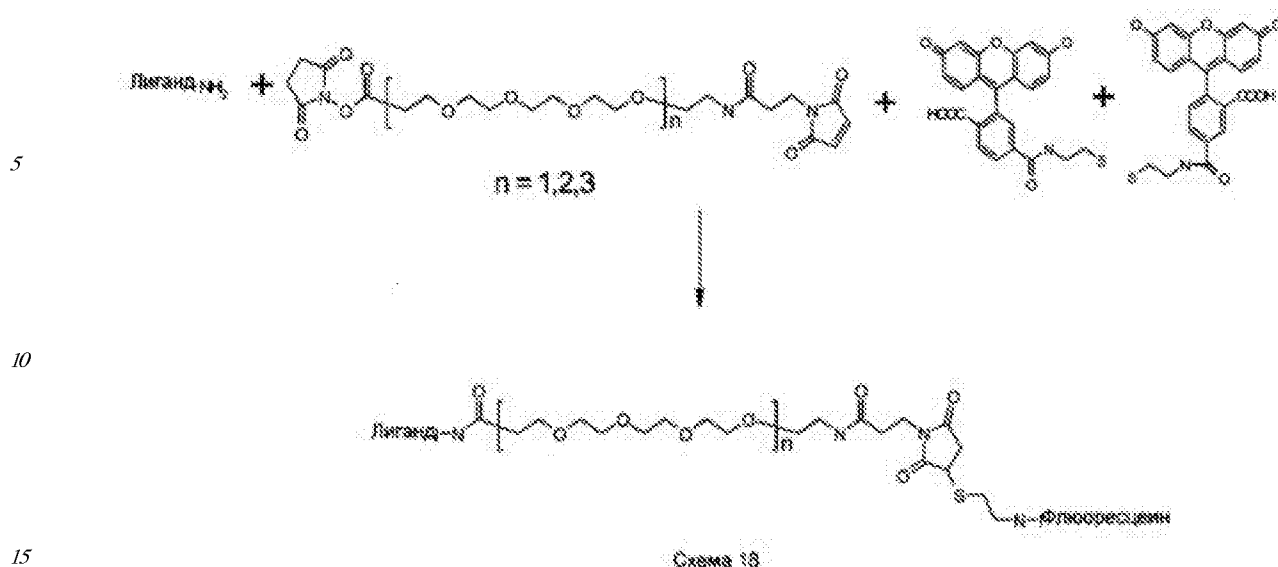
30 высушивали над безводным сульфатом натрия, концентрировали при пониженном давлении, перерастворяли в небольшом количестве метанола и этилацетата и затем обрабатывали диэтиловым эфиром с получением 140 мг аддукта флуоресцеина и цистамина в виде ярко-оранжевого твердого вещества.

35 Стадия 2. Аддукт флуоресцеина и цистамина (80 мг; 0,092 ммоль) растворяли в смеси 3:1 метанола и воды (4 мл) и добавляли TCEP гидрохлорид (80 мг; 3 экв.). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Продукт очищали путем ВЭЖХ с получением 78 мг вещества. LRMS (ESI) 435,0.

Получение конъюгатов меченных флуоресцеином низкомолекулярных соединений с ПЭГ

40

45



Общий способ. К раствору лиганда (1 экв.) в DMSO добавляли DIEA (2 экв.) и SM (PEG)_{4n} (1 экв.). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем добавляли флуоресцеин с тиольной ножкой (1 экв.) и реакционную смесь перемешивали еще в течение 10 мин. Продукт очищали путем ВЭЖХ.

СПОСОБЫ КОВАЛЕНТНОГО ПРИСОЕДИНЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНТЕГРИН-НАЦЕЛИВАЮЩИХ ЛИГАНДОВ К 5'-ТИОЛ-МИРНК ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМ

Получение миРНК

Синтез олигорибонуклеотидов

Олигорибонуклеотиды синтезировали по фосфоамидитной (амидофосфитной) технологии на твердой фазе с использованием установки для синтеза ABI 394 (Applied Biosystems), в масштабе 10 мкмоль.

смысловая цепь миРНК: SEO ID NO. 1

антисмысловая цепь миРНК: SEQ ID NO. 2

Соответствующие миРНК направлены к конститутивному гену АНА1. Синтез проводили на твердой подложке из стекла с контролируемым размером пор (CPG,

520 Å), с загрузкой 75 мкмоль/г, производства Prime Synthesis, Астон, Пенсильвания, США). Обычные фосфоамидиты РНК, 2'-О-метил-фосфоамидиты, а также вспомогательные реагенты заказывали в Proligo (Гамбург, Германия). В частности, использовали следующие амидиты: (5'-О-диметокситритил-N⁶-(бензоил)-2'-О-трет-бутилдиметилсилил-аденозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)-фосфоамидит, 5'-О-диметокситритил-N⁴-(ацетил)-2'-О-трет-бутилдиметилсилил-цитидин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфоамидит, (5'-О-диметокситритил-N²-(изобутирил)-2'-О-трет-бутилдиметилсилил-гуанозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфоамидит и 5'-О-диметокситритил-2'-О-трет-бутилдиметилсилил-уридин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)-фосфоамидит. 2'-О-Метилфосфоамидиты содержали такие же защитные группы, как и обычные амидиты РНК. Все амидиты растворяли в

безводном ацетонитриле (100 мМ) и добавляли молекулярные сита (3\AA) . Для

получения сульфогидрильного линкера на 5'-конце олигомера, 1-О-диметокситритил-гексил-дисульфида, использовали линкер 1'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]-фосфоамидит производства Glen Research (Стерлинг, Вирджиния, США). Перед конъюгированием низкомолекулярного соединения, дисульфидный линкер восстанавливали трис-(2-карбоксиэтил)фосфином (ТСЕР, см. ниже). Для мечения 5'-конца флюорофором Nu547 использовали соответствующий фосфоамидит производства Thermo Fisher (Милуоки, Висконсин). В качестве раствора активатора использовали 5-этил-тиотетразол (ЕТТ, 500 мМ раствор в ацетонитриле). Время конденсации составляло 6 минут. С целью введения фосфотиоатных (тиофосфатных) связей, использовали 100 мМ раствор 3-этокси-1,2,4-дитиазолин-5-она (EDITH, получали в Link Technologies, Ланкашир, Шотландия) в безводном ацетонитриле.

Расщепление и снятие защиты олигомера, связанного с подложкой

После завершения твердофазного синтеза высушенную твердую подложку переносили в пробирку на 15 мл и обрабатывали метиламином в метаноле (2 М, Aldrich) в течение 180 мин при 45°C. После центрифугирования супернатант переносили в новую пробирку на 15 мл и стекло СРG промывали с помощью 1200 мкл N-метилпирролидин-2-она (NMP, Fluka, Бухс, Швейцария). Смыв объединяли с метанольным раствором метиламина и добавляли 450 мкл триэтиламин-тригидрофторида (TEA·3HF, Alfa Aesar, Карлсруэ, Германия). Эту смесь доводили до 65°C в течение 150 мин. После охлаждения до комнатной температуры добавляли 0,75 мл NMP и 1,5 мл этокситриметилсилана (Fluka, Бухс, Швейцария). Через 10 мин выпавший в осадок олигорибонуклеотид собирали центрифугированием, супернатант отбрасывали и твердое вещество растворяли в 1 мл буфера А (см. ниже).

Очистка олигорибонуклеотидов

Неочищенные олигорибонуклеотиды очищали с помощью ВЭЖХ на сильном катионообменнике (SAX) с использованием препаративной колонки 22×250 мм DNA Pac 100 (Dionex, Идштайн, Германия) на установке АКТА Explorer (GE Healthcare). Буфер А содержал 10 мМ NaClO₄, 1 мМ EDTA, 10 мМ Tris, pH 7,4, 6 М мочевины и 20% ацетонитрил. Буфер В содержал 500 мМ NaClO₄ в Буфере А. Использовали скорость потока 4,5 мл/мин. Записывали УФ-сигнал при 260 и 280 нм. Использовали градиент от 20%В до 45%В за 55 мин. Нужные фракции объединяли и осаждали с помощью 3 М NaOAc, pH=5,2 и 70% этанола.

Неочищенные, меченные с помощью Nu547 олигомеры очищали в ходе препаративной ВЭЖХ с использованием колонки XTerra Prep MS C8 10×50 мм (Waters, Эшборн, Германия) на установке АКТА Explorer (GE Healthcare). Буфер А содержал 100 мМ ацетат триэтиламония (Biosolve, Валкенсвард, Нидерланды), а буфер В содержал 50% ацетонитрил в буфере А. Скорость потока составляла 5 мл/мин. Записывали УФ-сигнал при 260, 280 и 547 нм (в случае меченного с помощью Nu547 олигорибонуклеотида). Использовали градиент от 5%В до 60%В за 58 объемов колонки (CV). Нужные фракции объединяли и осаждали с помощью 3 М NaOAc, pH=5,2 и 70% этанола.

В конце очищенный олигомер обессаливали с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке, содержащей Sephadex G-25 (GE Healthcare). Концентрацию этого раствора определяли по измерению абсорбции при 260 нм на УФ-фотомере (Beckman Coulter, Крефельд, Германия). До ренатурации отдельные цепи хранили в виде замороженных растворов при -20°C.

Получение низкомолекулярных конъюгатов РНК

Низкомолекулярные соединения, содержащие малеимидную функциональную группу, ковалентно конъюгировали с РНК через тиоэфирную связь. Для осуществления этого химического процесса ~60 мг РНК, содержащей 5'-дисульфидный линкер, восстанавливали в воде (5 мл) до соответствующего тиола, с помощью 1 мл ТСЕР (0,5 М в воде, производства Sigma Aldrich). Как только анализ с помощью аналитической анионнообменной ВЭЖХ показывал завершение реакции (~2 ч при комнатной температуре), РНК осаждали с помощью 30 мл смеси этанол / 3 М NaOAc (pH 5,4) 32:1 (об.%) в течение ночи при -20°C. Осадок собирали центрифугированием и использовали для последующей конъюгации низкомолекулярного соединения.

В стандартной реакции конъюгации 10 мг РНК растворяли в 2 мл натрий-фосфатном буфере (0,1 М; pH 7,0). К этому раствору добавляли низкомолекулярное соединение (0,12 мМ) в ACN/NMP 1:1 (об. %) в течение 5 минут. Когда, по данным анализа RPLC-ESI MS, внесенная РНК была израсходована, смесь разбавляли водой (~10 мл) и добавляли ~40 мл смеси этанол / 3 М NaOAc (pH 5,4) 32:1 (об. %) для осаждения конъюгированной РНК в течение ночи при -20°C. Осадок собирали центрифугированием, растворяли в воде и при необходимости очищали с помощью анионообменной ВЭЖХ, следуя описанной выше процедуре. Если конъюгат был достаточно чистым, реакционную смесь фильтровали через колонку для гель-фильтрации (Sephadex G-25, GE Healthcare).

Гибридизация олигорибонуклеотидов для получения миРНК. Комплементарные цепи ренатурировали объединением эквимольных растворов РНК. Эту смесь лиофилизировали и растворяли в подходящем объеме буфера для гибридизации (100 мМ NaCl, 20 мМ фосфат натрия, pH 6,8) для достижения желаемой концентрации. Этот раствор помещали на водяную баню при 95°C, которую охлаждали до КТ в течение 3 ч. Таблица 3: информация о последовательности миРНК; строчные буквы: 2'-ОМе нуклеотид; s: тиофосфатная связь; dT: дезокситимидин; (C6SSC6): C-6 дисульфидный линкер; (Cy5): краситель цианин 5.

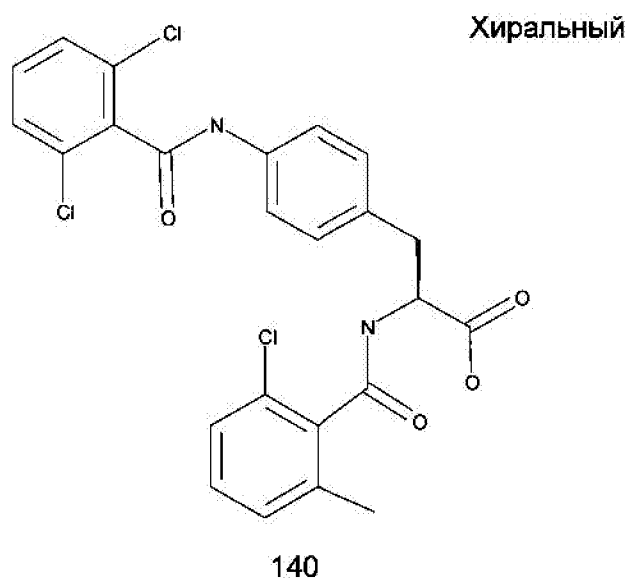
Ниже следующий анализ проводили для оценки эффективности ингибирования VLA-4-нацеленных соединений по настоящему изобретению в анализе связывания VLA-4/VCAM в клетках Jurkat.

Ниже следующий анализ адгезии был описан ранее и использован в настоящем изобретении с незначительными модификациями. См. Патенты США №№6229011 и 6380387, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Функциональная активность *in vitro* VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$)-нацеливающих липидов (из примеров) определяли с помощью анализа, основанного на клетках Jurkat (см. ниже), поскольку клетки Jurkat экспрессируют на высоком уровне VLA-4 на поверхности своей мембраны. Каждый анализ проводили на 96-луночном планшете, при этом VCAM-1 использовали в качестве противоиганда для клеток (т.е. VCAM-1 привязывали к поверхности лунок).

Более детально, 96-луночные иммунологические микропланшеты высокого связывания F96 Maxisorp (Nunc) сенсibiliзировали с помощью VCAM-1, 25 нг/лунку в течение ночи. В день эксперимента планшеты блокировали в течение 1 ч с помощью буфера PBS, содержащего 1% обезжиренное сухое молоко для предотвращения неспецифического связывания. Затем планшеты промывали с помощью DPBS (Физиологический раствор Дюльбекко, забуференный фосфатами) и промокали досуха. Избыток жидкости тщательно отсасывали из лунок.

В качестве контроля в контрольные лунки добавляли низкомолекулярный антагонист

(140) для ингибирования VLA-4, указанный выше, в буфере, содержащем 4% DMSO, и серийно разводили на планшете, как правило, в диапазоне концентраций от 1000 нМ до 0,2 нМ. Клетки Jurkat, клон E6-1 (ATCC), метили с помощью 100 мкг/мл 6-карбоксихлорофлуоресцеиндиацетата, флуоресцирующего красителя, и затем активировали в среде RPMI 1640, содержащей 0,5 мМ двухвалентные катионы Mn^{2+} и 0,05% бычий сывороточный альбумин. Следует отметить, что такая активация необходима для достижения максимального связывания для лиганда, и она может имитировать активацию интегринов цитокинами и хемокинами *in vivo*. Было определено, что контрольное соединение (27) характеризуется величиной IC_{50} примерно 12 нМ (т.е. 50% клеток не связались с VCAM-1 на поверхности лунок, поскольку рецепторы VLA-4 клеток предположительно образовали связь или ассоциат с контрольным соединением).



Для оценки VLA-4 ингибирования VLA-4-нацеленных соединений по настоящему изобретению (из примеров), клетки Jurkat (экспрессирующие на высоком уровне VLA-4) вносили в планшеты, покрытые VCAM-1, до конечной концентрации 2×10^5 клеток/лунку на 96-луночных планшетах и инкубировали с тестируемыми соединениями (derivatизированные миРНК, низкомолекулярные соединения) в течение 45 минут при 37°C. После удаления не связавшихся клеток путем осторожного промывания лунок с помощью PBS, считывали сигнал флуоресценции от связанных клеток на ридере для микропланшетов Tecan Safire2 при 450 нм. Наносили точки и определяли величины IC_{50} для каждого исследуемого соединения с помощью регрессионного анализа, используя линейный участок кривой концентрация-отклик. Эти результаты представлены ниже в Таблицах 4 и 5.

Доказательство клеточной проницаемости и локализации производных низкомолекулярных соединений для ковалентно связанных антагонистов интегрина с FITC-флуорофорами и миРНК для нацеленной доставки.

Процедура

AML MV4-11 клетки в питательной среде (RPMI 1640 с 10% FBS) инкубировали с Дуплексом-27 (500 нМ) в течение 1 ч при 37°C. Для определения VLA-4-независимого связывания, включали 140 (10 мкМ) при одних условиях для блокировки VLA-4-зависимого связывания. Затем по окончании инкубации клетки дважды промывали с помощью D-PBS и фиксировали в 1% параформальдегиде в течение 10 минут. Захват

миРНК анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии с визуализацией, с использованием ImageStreamx (Aminis Corporation, Сиэтл). Результаты представлены в Таблице А и на Фигурах 1-4.

Таблица А

Соединение (концентрация)	Средняя интенсивность СуЗ
без соединения	638
140 (10 мкМ)	663
Дуплекс-27 (500 нМ)	4007
140 (10 мкМ) + Дуплекс-27 (500 нМ)	2273

Анализ миРНК с модифицированной 5'-смысловой цепью на выключение иРНК АНА1 в клеточных системах
Материалы и Методы

Референсный ген:	GAPDH
Клеточная линия:	H1299_Nut-Оnc
Плотность посадки:	5000 клеток/лунку
Формат планшета:	96-луночный
Время от высевания до обработки:	0
Обработка контроля:	холостая, необработанная, контрольная миРНК
Реагент для трансфекции (TF):	DharmaFect1
Способ трансфекции	Обратная трансфекция
Объем TF-реагента на лунку	0,15 мл
конечная концентрация миРНК	50 нМ
Способ анализа:	День 1 ручной/День 2 Вошер

Обратная трансфекция: клетки H1299, трансфицированные с помощью указанной миРНК при конечной концентрации 50 нМ, с использованием реагента для трансфекции DharmaFect-1 в количестве 0,15 мкл/лунку. Затем клетки высевали в 96-луночный планшет в количестве 5000 клеток/лунку и инкубировали при 37°C в течение 48 ч.

Эффективность выключения миРНК измеряли с помощью анализа разветвленной ДНК, как рекомендовано производителем; результаты такого выключения показаны на Фиг. 5. Относительную жизнеспособность клеток оценивали по абсолютной экспрессии GAPDH в той же лунке (на Фиг. 6).

Если не указано обратное, все соединения в примерах получали и характеризовали, как описано выше. Все патенты и публикации, на которые даны ссылки в настоящем описании, полностью включены посредством ссылки.

Таблица 1

Перечень составов дериватизированных по 5'-концу одинарных и двойных цепей
миРНК

5

Дупле кс-ID	Смысло вая-ID	Последовательность 5'→3'	Антисмысл овая-ID	Последовательность 5'→3'
10 Дупле кс-1	Смысло вая-1	GGAuGAAGuGGAGAuuAGudTsdT (SEQ ID NO,1)	Антисмысл овая-1	ACuAAUCUCcACUUCAUCCdTsdT (SEQ ID NO 2)
Дупле кс-4	Смысло вая-4	VLA-4 Лиганд Реагент 8- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuAGudTsdT	Антисмысл овая-1	ACuAAUCUCcACUUCAUCCdTsdT
15 Дупле кс-5	Смысло вая-5	VLA-4 Лиганд Реагент 3- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuAGudTsdT	Антисмысл овая-1	ACuAAUCUCcACUUCAUCCdTsdT
Дупле кс-6	Смысло вая-6	VLA-4 Лиганд Реагент 1- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuAGudTsdT	Антисмысл овая-1	ACuAAUCUCcACUUCAUCCdTsdT
Дупле кс-7	Смысло вая-7	VLA-4 Лиганд Реагент 2- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuAGudTsdT	Антисмысл овая-1	ACuAAUCUCcACUUCAUCCdTsdT
20 Дупле кс-11	Смысло вая-11	VLA-4 Лиганд Реагент 11- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuAGudTsdT	Антисмысл овая-1	ACuAAUCUCcACUUCAUCCdTsdT
Дупле кс-12	Смысло вая-12	VLA-4 Лиганд Реагент 12- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuAGudTsdT	Антисмысл овая-1	ACuAAUCUCcACUUCAUCCdTsdT
Дупле кс-13	Смысло вая-13	VLA-4 Лиганд Реагент 9- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuAGudTsdT	Антисмысл овая-1	ACuAAUCUCcACUUCAUCCdTsdT
25 Дупле кс-14	Смысло вая-14	VLA-4 Лиганд Реагент 10- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuAGudTsdT	Антисмысл овая-1	ACuAAUCUCcACUUCAUCCdTsdT

30

35

40

45

Таблица 2

Данные анализа для низкомолекулярных конъюгатов миРНК

Небольшая молекула	Мишень	Номер	Последовательность (5'→3')	Вычисленная масса	Экспериментальная масса	IEX % FLP
VLA-4-1-PEG8-малеимид	Aha1	Смысловая-6	VLA-4 Лиганд Реагент 2- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	8167,0	8167,0	91,4
VLA-4-2-PEG4-малеимид	Aha1	Смысловая-4	VLA-4 Лиганд Реагент 8- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	7978,71	7982,0	85,3
VLA-4-1-PEG12-малеимид	Aha1	Смысловая-5	VLA-4 Лиганд Реагент 3- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	8337,79	8342,3	> 80
VLA-4-1-PEG4-малеимид	Aha1	Смысловая-6	VLA-4 Лиганд Реагент 1- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	7985,58	7990,0	71,9
VLA-4-PEG4-малеимид	Aha1	Смысловая-11	VLA-4 Лиганд Реагент 11- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	7982,18	7981,5	93,9
VLA-4-PEG8-малеимид	Aha1	Смысловая-12	VLA-4 Лиганд Реагент 12- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	8158,39	8158	87,0
VLA-4-PEG4-малеимид	Aha1	Смысловая-13	VLA-4 Лиганд Реагент 9- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	8059,14	8059	86,1
VLA-4-PEG8-малеимид	Aha1	Смысловая-14	VLA-4 Лиганд Реагент 10- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	8235,35	8234,8	93,7

Таблица 3

Перечень последовательностей миРНК, в которых 5'-антисмысловая цепь была дериватизирована с помощью Nu547

Дуплек с-ID	Смысловая-ID	Последовательность 5'→3'	Антисмысловая-ID	Последовательность 5'→3'
Дуплек с-24	Смысловая-24	VLA-4 Лиганд Реагент 8- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	Антисмысловая-1	(Nu547)ACuAAUCUCcACU UcAUCCdTsdT
Дуплек с-25	Смысловая-25	VLA-4 Лиганд Реагент 3- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	Антисмысловая-1	(Nu547)ACuAAUCUCcACU UcAUCCdTsdT
Дуплек с-26	Смысловая-26	VLA-4 Лиганд Реагент 1- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	Антисмысловая-1	(Nu547)ACuAAUCUCcACU UcAUCCdTsdT
Дуплек с-27	Смысловая-27	VLA-4 Лиганд Реагент 2- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	Антисмысловая-1	(Nu547)ACuAAUCUCcACU UcAUCCdTsdT
Дуплек с-31	Смысловая-31	VLA-4 Лиганд Реагент 11- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	Антисмысловая-1	(Nu547)ACuAAUCUCcACU UcAUCCdTsdT
Дуплек с-32	Смысловая-32	VLA-4 Лиганд Реагент 12- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	Антисмысловая-1	(Nu547)ACuAAUCUCcACU UcAUCCdTsdT
Дуплек с-33	Смысловая-33	VLA-4 Лиганд Реагент 9- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	Антисмысловая-1	(Nu547)ACuAAUCUCcACU UcAUCCdTsdT
Дуплек с-34	Смысловая-34	VLA-4 Лиганд Реагент 10- (SC6)GGAuGAAGuGGAGAuuuAGudTsdT	Антисмысловая-1	(Nu547)ACuAAUCUCcACU UcAUCCdTsdT

Таблица 4

Перечень активности низкомолекулярных конъюгатов миРНК в анализах антагонистов интегрина и данные по KD для миРНК

Нацеливающий элемент	Конфигурация				Дериватизированная миРНК	Jurkat клетки/VC AM-1 анализ адгезии (нМ)	αVβ3 анализ адгезии (нМ)	LFA1 анализ адгезии (нМ)	АН A1 % KD
	Небольшая молекула Лиганда Реагент	миРНК		Флуорофором					
нет		АНА-1	Дуплекс -1	нет	RD-03518	> 200			98
нет		АНА-1	Дуплекс -1N	Nu547	RD-05170	> 200			
VLA-4 Лиганд 3-PEG 4	VLA-4 Лиганд Реагент 8	АНА-1	Дуплекс -4	нет	RD-04707	28			97
VLA-4 Лиганд 2-PEG 12	VLA-4 Лиганд Реагент 3	АНА-1	Дуплекс -5	нет	RD-04708	158			97
VLA-4 Лиганд 2-PEG 4	VLA-4 Лиганд Реагент 1	АНА-1	Дуплекс -6	нет	RD-04709	51			98
VLA-4 Лиганд 2-PEG 8	VLA-4 Лиганд Реагент 2	АНА-1	Дуплекс -7	нет	RD-04710	55			97
VLA-4 Лиганд 3-PEG 4	VLA-4 Лиганд Реагент 8	АНА-1	Дуплекс -24	Nu547	RD-04714	39			36
VLA-4 Лиганд 2-PEG 12	VLA-4 Лиганд Реагент 3	АНА-1	Дуплекс -25	Nu547	RD-04715	147			25
VLA-4 Лиганд 2-PEG 4	VLA-4 Лиганд Реагент 1	АНА-1	Дуплекс -26	Nu547	RD-04716	61			30
VLA-4 Лиганд 2-PEG 8	VLA-4 Лиганд Реагент 2	АНА-1	Дуплекс -27	Nu547	RD-04717	48			25
VLA-4 Лиганд 4-PEG 4	VLA-4 Лиганд Реагент 11	АНА-1	Дуплекс -11	No	RD-04812	30			
VLA-4 Лиганд 4-PEG 8	VLA-4 Лиганд Реагент 12	АНА-1	Дуплекс -12	No	RD-04813	24			
VLA-4 Лиганд 5-PEG 4	VLA-4 Лиганд Реагент 9	АНА-1	Дуплекс -13	No	RD-04814	34			
VLA-4 Лиганд 5-PEG 8	VLA-4 Лиганд Реагент 10	АНА-1	Дуплекс -14	No	RD-04815	44			
VLA-4 Лиганд 4-PEG 4	VLA-4 Лиганд Реагент 11	АНА-1	Дуплекс -31	Nu547	RD-04822	41			
VLA-4 Лиганд 4-	VLA-4 Лиганд	АНА-1	Дуплекс -32	Nu547	RD-04823	23			

	PEG 8	Реагент 12							
5	VLA-4 Лиганд 5-PEG 4	VLA-4 Лиганд Реагент 9	АНА-1	Дуплекс -33	Nu547	RD-04824	26		
	VLA-4 Лиганд 5-PEG 8	VLA-4 Лиганд Реагент 10	АНА-1	Дуплекс -34	Nu547	RD-04825	31		
10	VLA-4 небольшая молекула			140			4		
	Отрицательный контроль			FITC-22			> 200		
	Отрицательный контроль			FITC-23			> 200		

15

20

25

30

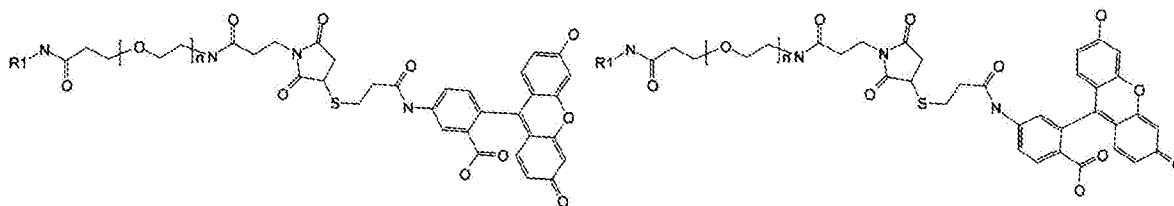
35

40

45

Таблица 5

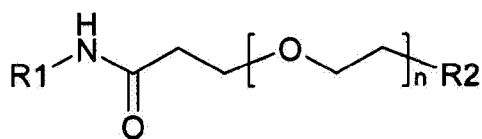
Идентичность, характеристика и связывающая активность меченых изомером FITC реагентов



При мер	Нацеливающий элемент	Способ синтеза: в одном реакционном сосуде или с соответствующим нацеливающим агентом	Jurkat клетки/V CAM-1 анализ адгезии (IC50 нМ)	α VB 3 анализ адгезии (IC50 нМ)	LFA1 анализ адгезии (IC50 нМ)	Выч исленная масса	Реальная масса
FITC-12	VLA-4 Лиганд 1-PEG8-FITC	VLA-4 Лиганд Реагент 2	199			1502,47	1503,7 [M+H] ⁺
FITC-13	VLA-4 Лиганд 2-PEG4-FITC	VLA-4 Лиганд Реагент 5	90			1433,16	1431,0 [M+H] ⁺
FITC-14	VLA-4 Лиганд 2 по linker: FITC amide	Сочетание с амидом FITC карбоксилата и VLA-4 лиганд 2	15			956,0942	956,0937 (M+H) ⁺
FITC-15	VLA-4 Лиганд 5-PEG4-FITC	VLA-4 Лиганд Реагент 9	175			1397,3	1398,2 [M+H] ⁺
FITC-16	VLA-4 Лиганд 5-PEG8-FITC	VLA-4 Лиганд Реагент 10	178			1573,51	1573,6 [M+H] ⁺
FITC-22	ненацеленный-ПЭГ4-FITC	Способ В (один реакционный сосуд)	9,400			941,019	941,3269 (M+H) ⁺
FITC-23	ненацеленный-ПЭГ8-FITC	Способ В (один реакционный сосуд)	>200		>10,000	1117,23	1117,4317 [M+H] ⁺
142	Положительный контроль				74		
140	Положительный контроль		4				
141	Положительный контроль			2			

(57) Формула изобретения

1. Соединение формулы I:

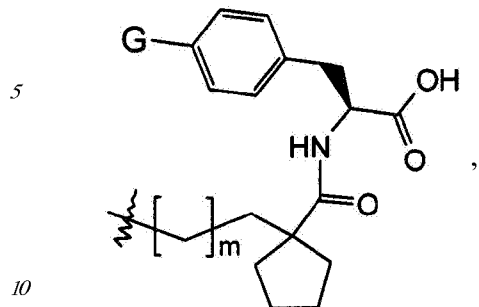


Формула I

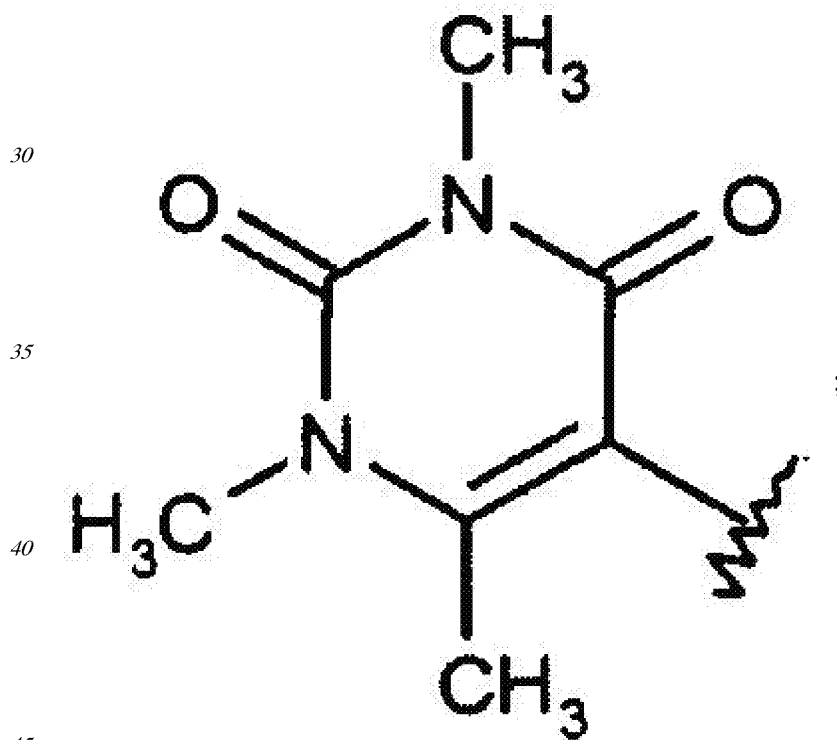
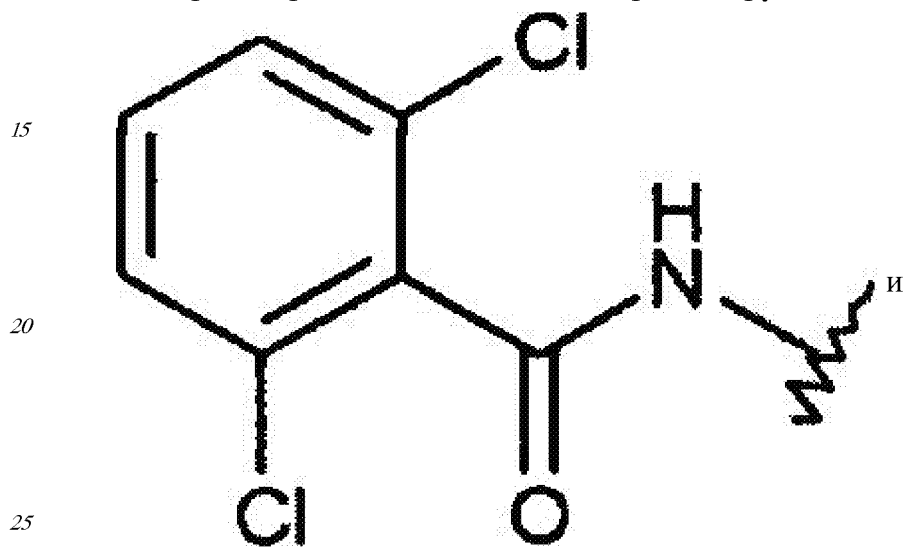
или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; в котором n равно от 1 до 24 и в котором:

R1 выбран из группы, состоящей из:

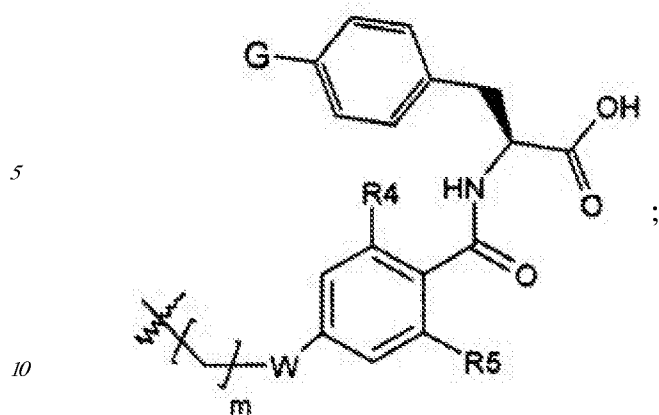
(1) соединения формулы:



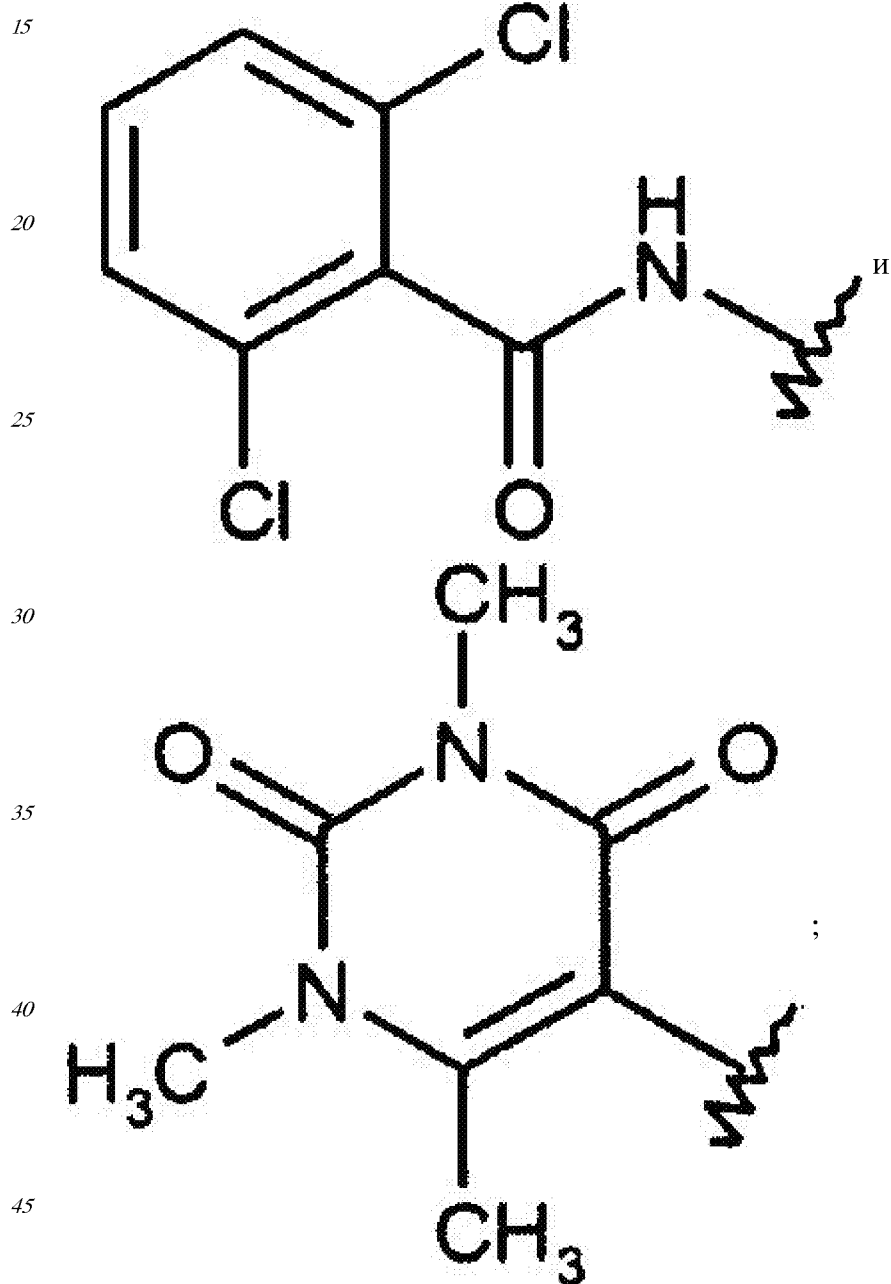
в котором m равно от 0 до 3, а G выбран из группы, состоящей из:



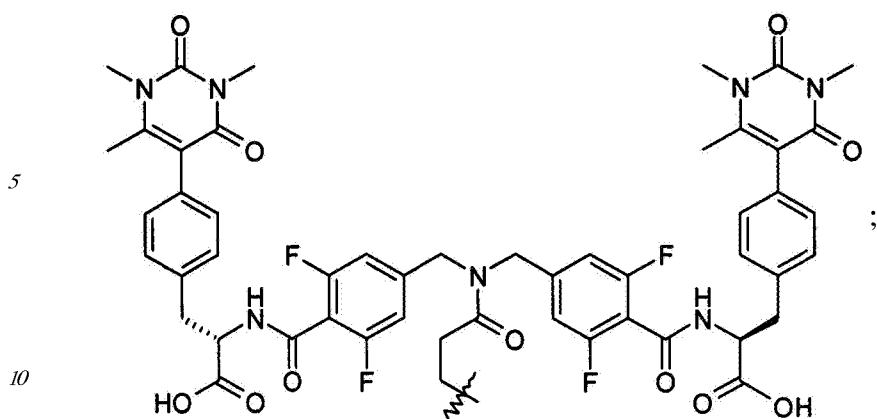
(2) соединения формулы:



в котором m равно от 0 до 3, R_4 и R_5 представляют собой независимо галоген, W представляет собой O или CH_2 , а G выбран из группы, состоящей из:

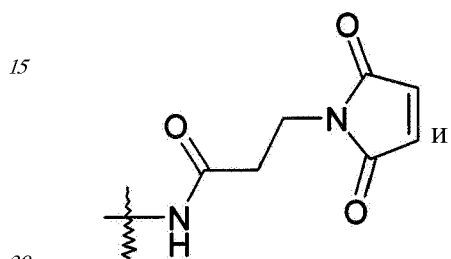


(3) соединения формулы:

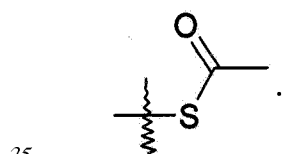


R2 выбран из группы, состоящей из:

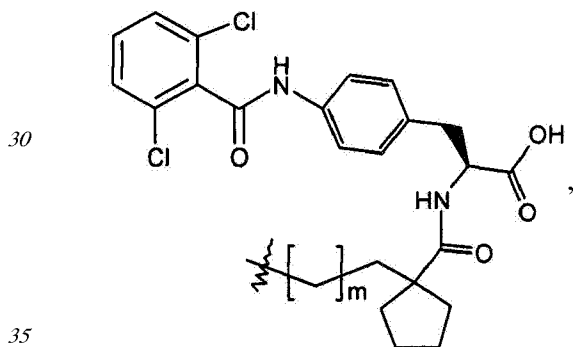
(1) соединения формулы:



(2) соединения формулы:

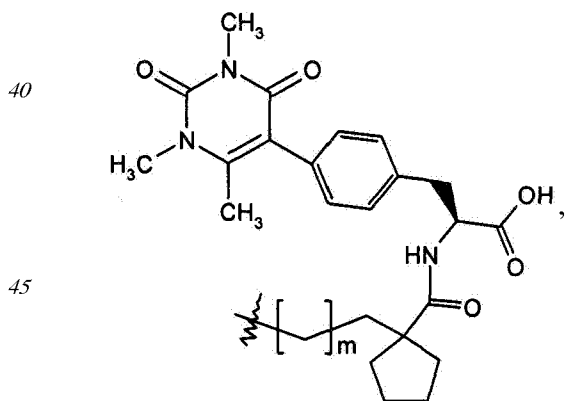


2. Соединение по п. 1, в котором R1 представляет собой соединение формулы:



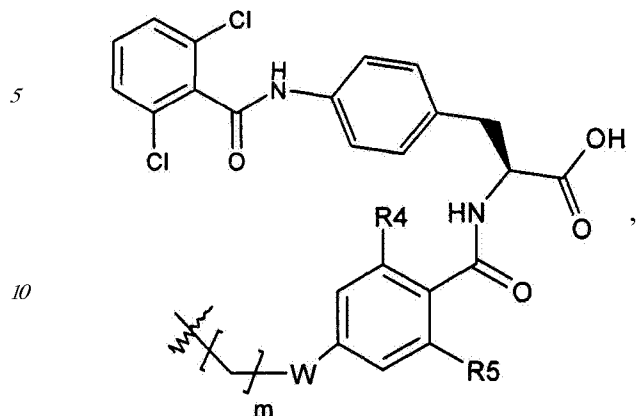
где m равно от 0 до 3.

3. Соединение по п. 1, в котором R1 представляет собой соединение формулы:



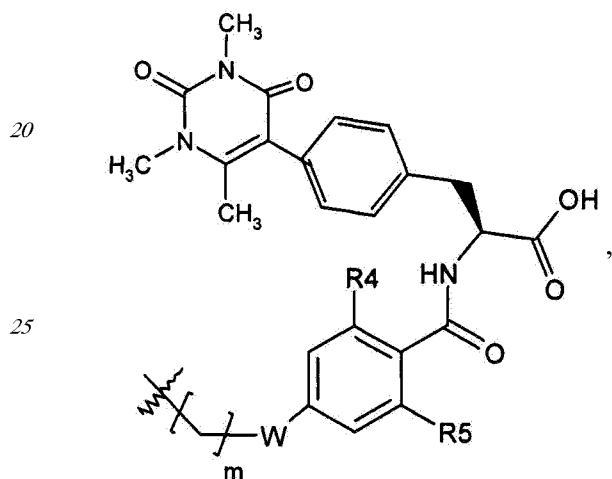
где m равно от 0 до 3.

4. Соединение по п. 1, в котором R1 представляет собой соединение формулы:



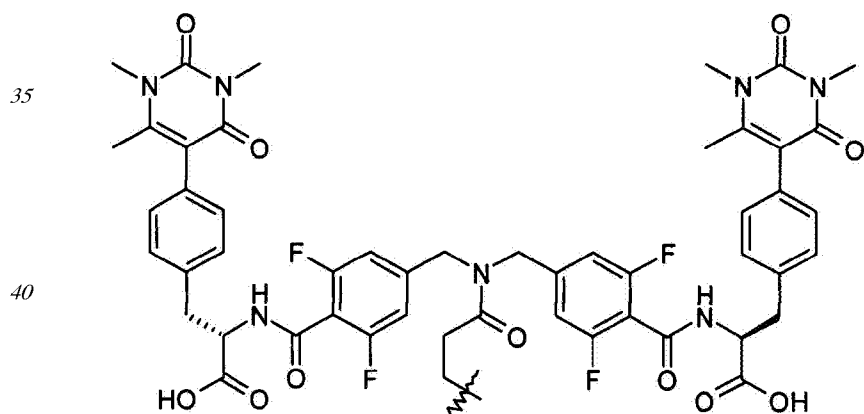
15 где m равно от 0 до 3, R4 и R5 представляют собой галоген, а W представляет собой O или CH₂.

5. Соединение по п. 1, в котором R1 представляет собой соединение формулы:



30 где m равно от 0 до 3, R4 и R5 представляют собой галоген, а W представляет собой O или CH₂.

6. Соединение по п. 1, в котором R1 представляет собой соединение формулы:



45 7. Соединение по любому из пп. 1-6, в котором R2 представляет собой соединение формулы:

пропионовая кислота;

(S)-2-[2,6-дихлор-4-[3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино]пропокси]бензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-

5 тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]пропионовая кислота и

(S)-2-[4-[(3-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропиониламино]-этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино)метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]-пропионовой кислоты трифторацетатная соль.

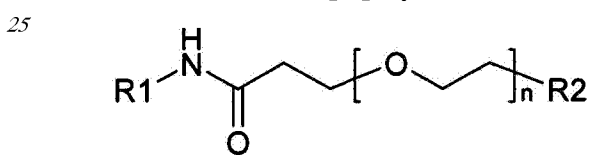
10 12. Соединение по п. 1, выбранное из группы, состоящей из следующих соединений:

(S)-2-[4-[(3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидропиррол-1-ил)пропионил-амино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино)-метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-

15 (S)-2-[4-[(3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-ацетилсульфанил-этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино)метил]-2,6-дифторбензоиламино]-3-[4-(1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил]-пропионовая кислота и

(S)-2-[4-[(3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-ацетилсульфанилэтанокси)этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропиониламино]пропионил]-[4-[(S)-1-карбокси-2-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]этилкарбамоил]-3,5-дифторбензил-амино]метил]-2,6-дифторбензиламино]-3-[4-[1,3,6-триметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил]фенил]пропионовая кислота.

13. Соединение формулы I:

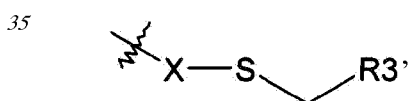


30 **Формула I**

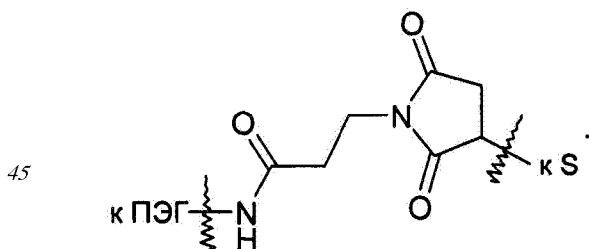
или его фармацевтически приемлемая соль или эфир; в котором n равно от 1 до 24 и в котором:

R1 является таким, как определено в п. 1;

R2 представляет собой соединение формулы:



в котором R3 представляет собой конъюгированный фрагмент, выбранный из молекулы миРНК или флюоресцеинизотиоцианата, а X представляет собой соединение формулы:



14. Фармацевтическая композиция для нацеленной доставки миРНК или

флюоресцеинизотиоцианата к клеткам-мишеням, экспрессирующим рецептор VLA-4, включающая эффективное количество соединения по п. 13 и фармацевтически приемлемый носитель.

5 15. Способ нацеленной доставки миРНК или флюоресцеинизотиоцианата к клеткам-мишеням, экспрессирующим рецептор VLA-4, включающий введение эффективного количества соединения по п. 13.

16. Применение соединения по п. 13 для нацеленной доставки миРНК или флюоресцеинизотиоцианата к клеткам-мишеням, экспрессирующим рецептор VLA-4.

10

15

20

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> F. Hoffmann - La Roche AG

<120> КОНЪЮГАТЫ АНТАГОНИСТОВ ИНТЕГРИНА ДЛЯ НАЦЕЛЕННОЙ ДОСТАВКИ К КЛЕТКАМ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИМ VLA-4

<130> 30809 WO

<150> US61/591295

<151> 2012-01-27

<150> US61/670666

<151> 2012-07-12

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA targeting AHA1

<400> 1

ggaugaagug gagauuagut t
21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

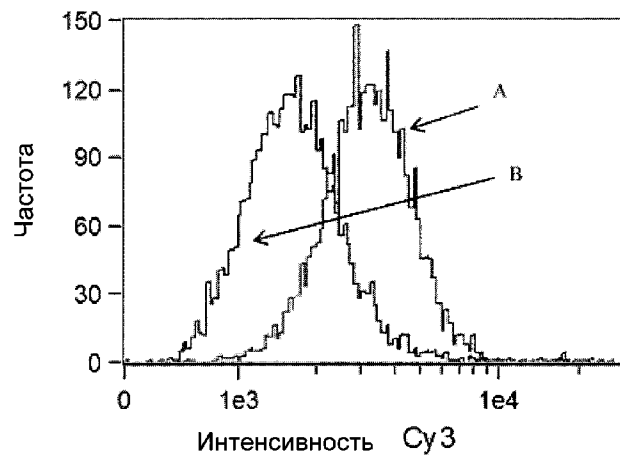
<220>

<223> siRNA targeting AHA1

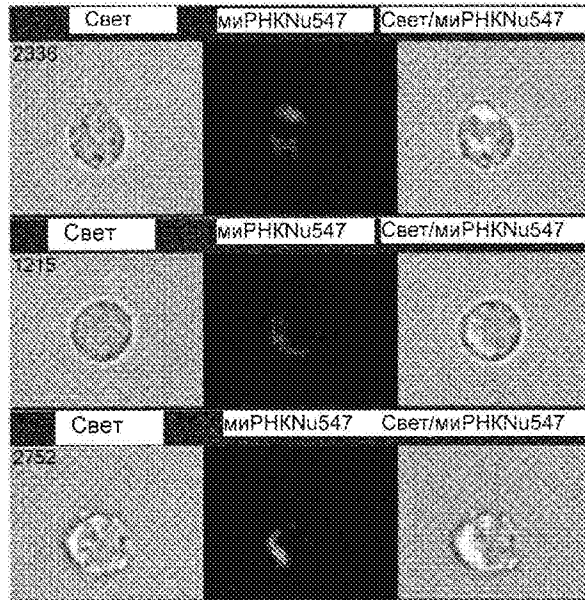
<400> 2

acuaaucucc acuucaucct t
21

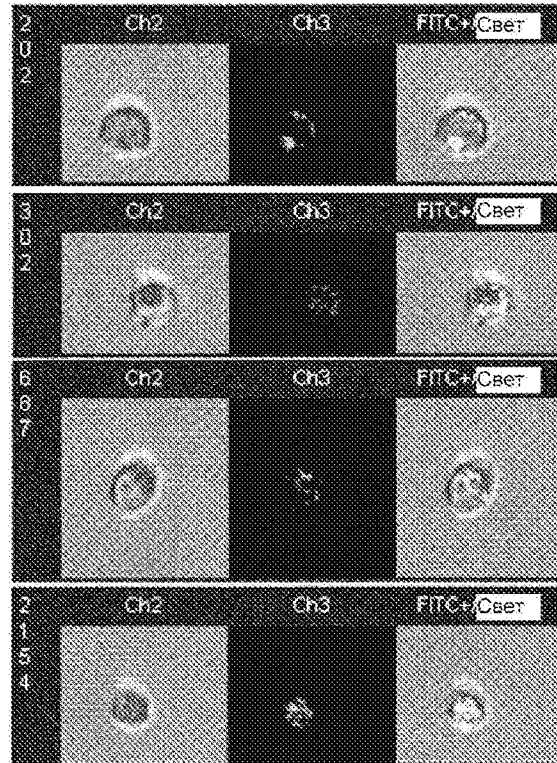
Фиг. 1



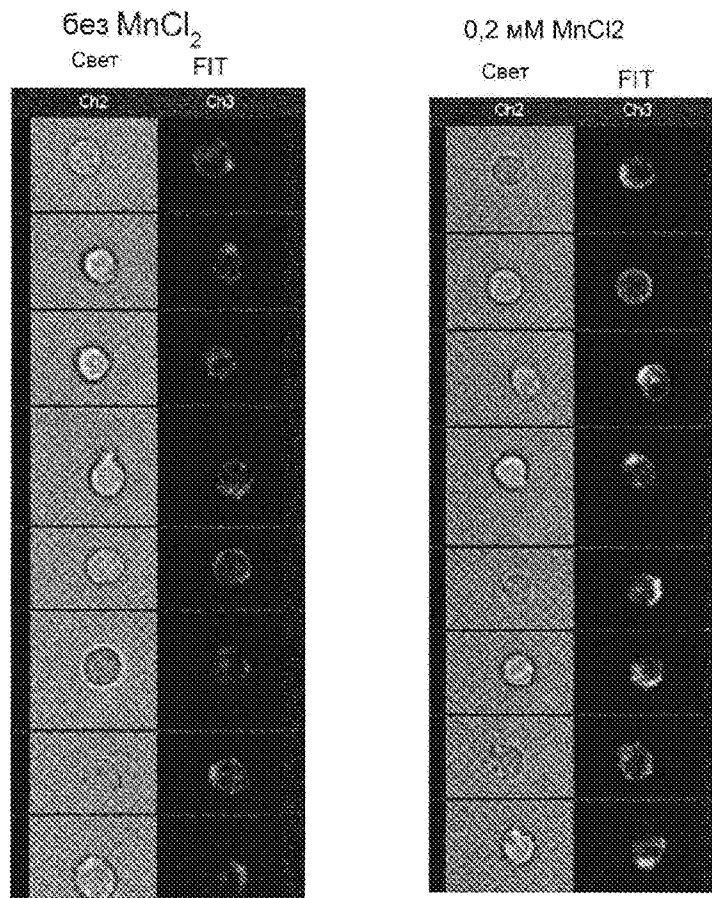
Фиг. 2



Фиг. 3

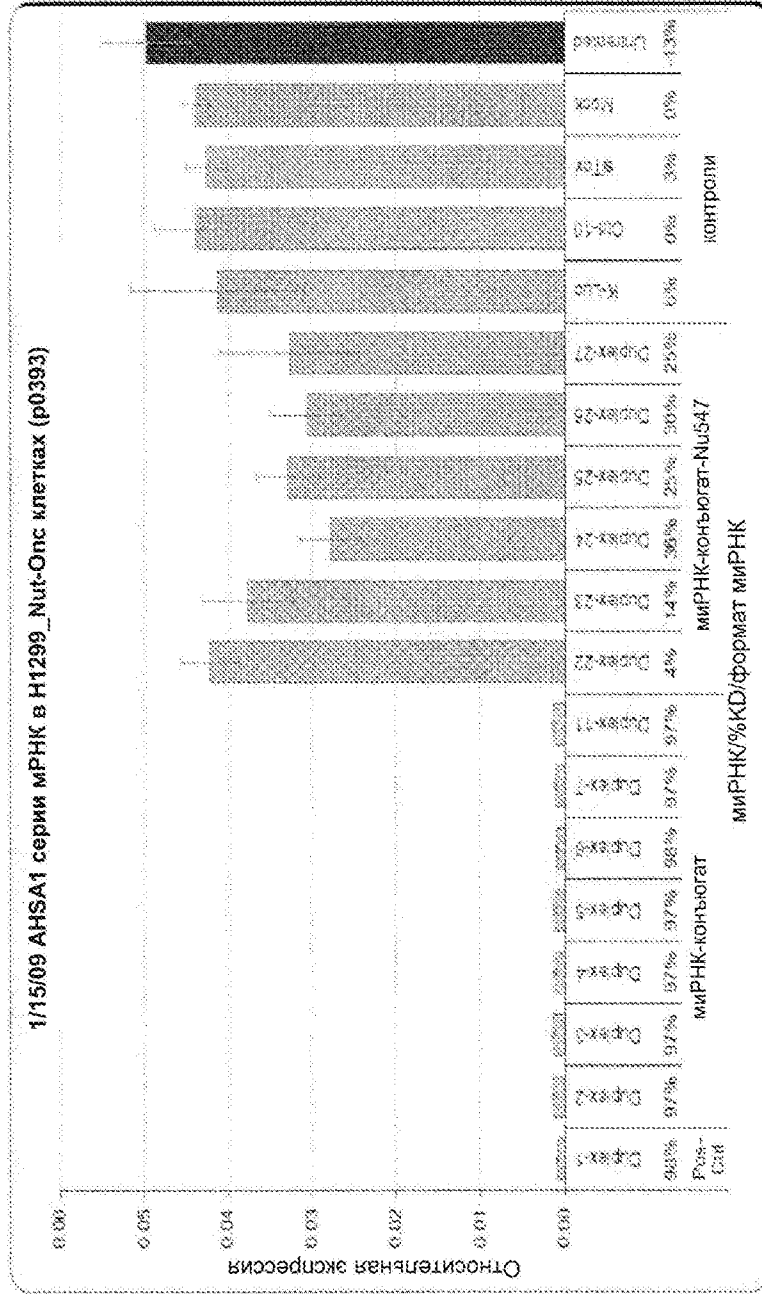


Фиг. 4



11

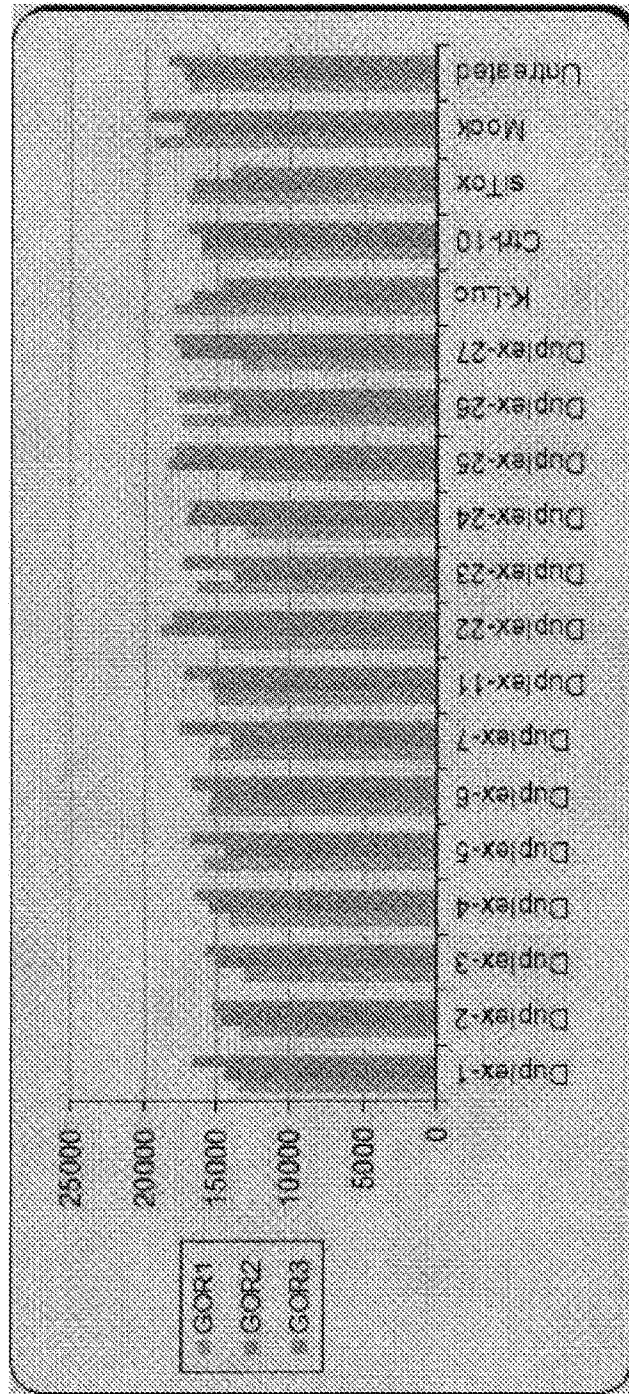
Фиг. 5



Duplex=Дуплекс, Pos-ctrl=положительный контроль, utreated= не обрабатывали

12

Фиг. 6



Duplex=Дуплекс, untreated= не обрабатывали