(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 037648 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.27

(21) Номер заявки
201391382

(22) Дата подачи заявки
2012.03.23

(51) Int. Cl. ***C40B 20/08*** (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
C40B 30/04 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИБЛИОТЕКИ ПЕПТОИДНЫХ ЛИГАНДОВ

(31) **61/467,256; 61/491,717; 61/583,881**
(32) **2011.03.24; 2011.05.31; 2012.01.06**
(33) **US**
(43) **2014.09.30**
(86) **PCT/US2012/030223**
(87) **WO 2012/129457 2012.09.27**

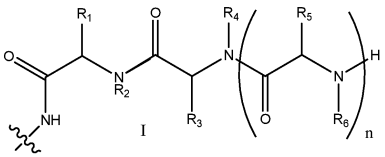
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОПКО ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:
Моола Муралидхар Редди, Шилке Джессика (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20090246124
US-A1-20100303805
US-A1-20020018778
US-B2-7354584
GARCIA-ARRARAS et al.: (23 July 1993), Enteric nerve fibers of holothurians are recognized by an antibody to acetylated alpha-tubulin. Neuroscience Letters, 1993, vol 157, Pgs 153-156, entire document
US-A1-20090111102
US-A1-20070054847
US-A1-20100266610
US-A1-20100303835
US-B2-7776313
US-A-5834318
NEUMANN et al.: SPR-based Fragment Screening: Advantages and Applications. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2007, vol. 7, Pgs. 1630-1642, entire document

(57) Изобретение относится к способу определения вызванной лекарственным средством реакции у субъекта, включающему контактирование библиотеки пептоидных лигандов на носителе с биологическим образцом, предварительно полученным у указанного субъекта; определение характеристик связывания одного или более биологических маркеров в указанном образце с одним или более пептоидными лигандами в библиотеке и определение того, связаны ли указанные один или более биологических маркеров с указанной вызванной лекарственным средством реакцией, что обеспечивает определение указанной вызванной лекарственным средством реакции у указанного субъекта, где указанная вызванная лекарственном средством реакция является нежелательной реакцией на указанное лекарственное средство, побочным эффектом указанного лекарственного средства, устойчивостью к указанному лекарственному средству или эффективностью терапевтической дозы указанного лекарственного средства, где указанная библиотека содержит соединение формулы (I), таким образом диагностируя указанную вызванную лекарственным средством реакцию у субъекта. Данное изобретение позволяет существенно повысить число высокоаффинных лигандов, которые служат диагностическими средствами, а также потенциальными терапевтическими средствами.



I

037648 B1

037648 B1

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительным патентным заявкам США 61/467256, 61/491717 и 61/583881 от 24 марта 2011 г., 31 мая 2011 г. и 6 января 2012 г., полное описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способам диагностики и лечения с применением библиотеки лигандов и активных соединений, являющихся их производными. В частности, настоящее изобретение относится к применению библиотеки лигандов для поиска лигандов, применяемых для определения профилей биомаркеров заболевания и для диагностики или детектирования реакции на лекарство, включая нежелательные реакции на лекарство, побочные эффекты, устойчивость к лекарству и терапевтическую эффективность. Настоящее изобретение также относится к идентификации биомаркеров, ассоциированных (связанных) с вызванной лекарственным средством реакцией, и обеспечению персонализированного лечения.

Уровень техники

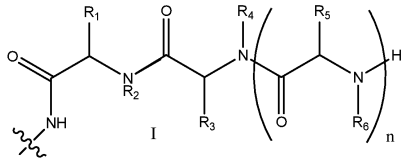
Низкомолекулярные микроматрицы становятся все более важными инструментами в комбинаторной химии. Указанные матрицы обычно получают, вначале синтезируя комбинаторную библиотеку на подходящей смоле в форме бусин, разделяя бусины в лунках микротитрационных планшетов с последующим высвобождением соединений из бусин. Полученный раствор затем автоматически наносят на химически модифицированное предметное стекло, ковалентно присоединяя молекулы библиотеки к его поверхности. В качестве альтернативы, существуют способы синтеза некоторых классов соединений in situ на поверхности матрицы. Наиболее частым применением низкомолекулярных микроматриц является их применение в качестве универсальной платформы для скрининга библиотек, обычно с целью выявления низкомолекулярных лигандов для исследуемого белка.

В заявке на патент США 2007/0003954 раскрыт способ получения профиля белков и антител с использованием микроматриц с низкомолекулярными соединениями. В этой заявке раскрыты лиганды, связывающиеся с лиганд-связывающими молекулами, причем лиганды организованы в виде матриц синтетических молекул, используемых для скрининга на биомаркеры молекулярные отпечатки пальцев. Конкретные матрицы, описанные в этой заявке включают, например, макроматрицу пептоидов, содержащую 7680 различных соединений, связанных с матрицей. В этом описании библиотеки на основе бусин используются в качестве исходного средства получения пептоидов, которые затем переносят в микроматрицы, содержащие адресуемые положении, для скрининга биологических жидкостей. Результатом скрининга является уникальный паттерн или "молекулярный отпечаток пальца" для любого конкретного белка в сложной биологической смеси. В заявке на патент США № 2010/0303805, которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки, раскрыто несколько пептоидов и диагностические наборы, которые можно применять для скрининга биологических жидкостей на биомаркеры, связанные с заболеваниями центральной нервной системы. Конкретные мономеры, которые согласно этой заявке применяются для формирования матриц, также могут быть использованы в новом способе скрининга согласно настоящему изобретению, при условии увеличения библиотеки до значительно большего количества бусин/пептоидов или бусин/лигандов, например, от более чем 100 тысяч до 150 млн.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что значительно более крупные библиотеки на основе бусин (по сравнению с микроматричными системами скрининга на биомеркеры-антитела или системами скрининга клеток на основе бусин) в соответствующих условиях могут быть непосредственно использованы для скрининга сложных биологических образцов с целью обнаружения реакции на лекарственное средство, а также в качестве значительно более обширного пула лигандов, которые связываются с такими лиганд-связывающими молекулами. Такой значительно более обширный пул включает существенно повышенное число высокоаффинных лигандов, которые служат диагностическими средствами, а также потенциальными терапевтическими средствами.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение включает способ определения вызванной лекарственным средством реакции у субъекта, включающий контактирование библиотеки пептоидных лигандов на носителе с биологическим образцом, предварительно полученным у указанного субъекта; определение характеристик связывания одного или более биологических маркеров в указанном образце с одним или более пептоидными лигандами в библиотеке и определение того, связаны ли указанные один или более биологических маркеров с указанной вызванной лекарственным средством реакцией, что обеспечивает определение указанной вызванной лекарственным средством реакции у указанного субъекта, где указанная вызванная лекарственным средством реакция является нежелательной реакцией на указанное лекарственное средство, побочным эффектом указанного лекарственного средства, устойчивостью к указанному лекарственному средству или эффективностью терапевтической дозы указанного лекарственного средства, где указанная библиотека содержит соединение формулы (I)



I

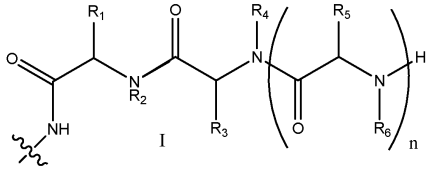
и где R_1 представляет собой $-(C_1-C_6)SCH_3$; R_2 представляет собой H; R_3-R_6 независимо выбраны из групп, состоящих из H, $-C_1-C_6$-алкила, $-C_1-C_6$-алкил-SCH_3; $-C_0-C_6$-алкил-C_2-C_6-алкенила, $-C_0-C_6$-алкил-C_2-C_6-алкинила, $-C_1-C_6$-COOH, $-C_1-C_6$-алкил-OH, $-C_1-C_6$-алкил-NH_2, $-C_3-C_8$-циклоалкила, $-C_1-C_6$-алкиларила, $-C_1-C_6$-алкилгетероарила, $-C_1-C_6$-алкил-$NC(O)C_1-C_6$-алкила, $-C_1-C_6$-алкилциклоамида, причем любая из арильных или гетероарильных групп может независимо содержать в качестве заместителей -OH, Cl, F, Br, $-OCH_3$, $-SO_2NH_2$ или $-O-CH_2-O-$; и n представляет собой 3-11, где указанная библиотека содержит приблизительно от 200000 до 150 млн отдельных лигандов, таким образом диагностируя указанную вызванную лекарственным средством реакцию у субъекта. Указанное лекарственное средство может представлять собой аторвастатин, клопидогрел, этанерцепт, флутиказон, салметерол, инфликсимаб, валсартан, ритуксимаб, эзомепразол, бевацизумаб, арипипразол, трастузумаб, оланзапин, кветиапин, адалимумаб, монтелукаст, эноксапарин, венлафаксин, пиоглитазон, кандесартан, эсциталопрам, глатирамер или их комбинацию.

Дополнительно способ может включать этап определения, является ли субъект чувствительным или нечувствительным к лечению или терапии с применением указанного лекарственного средства, на основании определенной вызванной лекарственным средством реакции. Указанная вызванная лекарственным средством реакция может быть связана с заболеванием или стадией указанного заболевания.

Данное заболевание может представлять собой рак, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, инфекционное заболевание, нейродегенеративное заболевание или сердечно-сосудистое заболевание. В частности, рак может представлять собой рак молочной железы, рак легких, рак предстательной железы, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак яичка, рак яичников, рак кожи, рак головного мозга, рак поджелудочной железы, рак печени, рак желудка, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак пищевода, лимфому или лейкоз, причем лиганды, распознающие маркеры, уникальны для этих болезненных состояний. В определенных вариантах реализации настоящего изобретения, аутоиммунное заболевание представляет собой волчанку, миастению гравис, рассеянный склероз, нарколепсию, ревматоидный артрит, нефрит, болезнь Шагаса, склеродермию или болезнь Шегрена. Инфекционное заболевание может являться следствием вирусной, бактериальной или грибковой инфекции. Нейродегенеративное заболевание может представлять собой болезнь Альцгеймера, деменцию или болезнь Крейцфельда-Якоба.

Предпочтительно указанная библиотека лигандов содержит множество лигандов, выявленных ранее в начальном скрининге или заранее выбранных на основании известной способности к взаимодействию с указанными лигандсвязывающими маркерами.

Согласно изобретению библиотека содержит соединение формулы I



I

причем указанные соединения получают способом, включающим применение реагентов, выбранных из группы, состоящей из

(A) фурфуриламина; 3,4-диметоксиэтаноламина; бензиламина; N-(2-аминоэтил)ацетамида; N-(3-аминопропил)-2-пирролидинона; этаноламина; глицина; диаминобутана; аллиламина; пипероniламина; метилбензиламина; изобутиламина; 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонамида или циклогексиламина; или

(B) метоксиэтиламина; пипероniламина; циклогексиламина; диаминобутана; метилбензиламина; изобутиламина; фурфуриламина или 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонамида; или

(C) фурфуриламина; этаноламина; глицина; диаминобутана; аллиламина; пипероniламина; метилбензиламина; изобутиламина или 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонамида; или

(D) фурфуриламина; N-(2-аминоэтил)ацетамида; N-(3-аминоэтил)-2-пирролидинона; этаноламина; глицина; диаминобутана; аллиламина; пипероniламина; метилбензиламина; изобутиламина; 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонамида; или

(E) цистеина, глицина, аллиламина, этаноламина, изобутиламина, метилбензиламина, пипероniламина, метионина, циклогексиламина, 3,4-диметоксифенетиламина, бензиламина, N-(2-аминоэтил)ацетамида, N-(3-аминопропил)-2-пирролидона, 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонамида и фурфуриламина; и

при этом

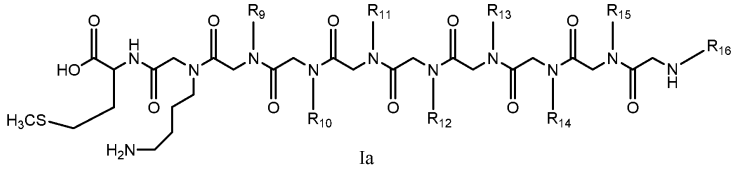
R_1 выбран из группы, состоящей из $-(C_1-C_6)-SCH_3$;

R_2 выбран из H;

R_3 и R_5 независимо выбраны из групп, состоящих из H, -C_1-C_6-алкила, -C_1-C_6-алкил-SCH_3; -C_0-C_6-алкил-C_2-C_6-алкенила, -C_0-C_6-алкил-C_2-C_6алкинила, -C_1-C_6-COOH, -C_1-C_6-алкил-OH, -C_1-C_6-алкил-$N(R)_2$, -C_3-C_8-циклоалкила, -C_1-C_6-алкиларила, -C_1-C_6-алкилгетероарила, -C_1-C_6-алкил-$NC(O)C_1$-C_6-алкила, -C_1-C_6-алкилциклоамида, причем любая из арильных или гетероарильных групп может независимо содержать в качестве заместителей -OH, Cl, F, Br, -OCH_3, -SO_2NH_2 или -O-CH_2-O-;

R_4 выбрана из группы, состоящей из фурфурила или -(C_1-C_6-алкил)NR_7R_8,

R_6 выбрана из группы, состоящей из H, 1-ил-аллила, 1-ил-2-гидроксиэтила, изобутила, 1-ил-n-бутиламина, метилбензила, пиперонила, циклогексила, 1-ил-2-(3,4-диметоксифенил)этила, бензила, 1-ил-2-(ацетамид)этила, 1-ил-3-2-пирролидинона, 1-ил-2-(4-бензолсульфонамид)этила и фурфурила, и n составляет от 3 до 11. В еще одном варианте реализации настоящего изобретения, библиотека содержит соединение формулы Ia



Ia

причем указанное соединение выбрано из группы, состоящей из соединения формулы Ia, причем:

(a) R_9 представляет собой n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид)этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(b) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид)этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой 1-ил-2,2-диметилэтил (изобутил); R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид)этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(c) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид)этил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(d) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой изобутил, и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(e) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой пиперонил;

(f) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изопропил; R_{12} представляет собой изопропил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил;

(g) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил, и R_{16} представляет собой циклогексил;

(h) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой пиперонил;

(i) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(j) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид)этил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(k) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой изобутил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид)этил; R_{12} представляет собой пиперонил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(l) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-N-бутиламин; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой изобутил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(m) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой фурфурил и R_{16} представляет собой фурфурил;

(n) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой фурфурил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой фурфурил;

(o) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой пиперонил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(p) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламини R_{16} представляет собой изобутил;

(q) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(r) R_9 представляет собой метилбензил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой пиперонил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(s) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой пиперонил;

(t) R_9 представляет собой метилбензил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой изобутил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(u) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой изобутил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(v) R_9 представляет собой изобутил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой пиперонил и R_{16} представляет собой пиперонил;

(w) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид)этил; R_{10} представляет собой изобутил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{14} представляет собой изобутил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(x) R_9 представляет собой фурфурил; R_{10} представляет собой фурфурил; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(y) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой пиперонил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(z) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(aa) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой метилбензил;

R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил;

(bb) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой изобутил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой пиперонил;

(cc) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой циклогексил; R_{12} представляет собой пиперонил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(dd) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{14} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(ee) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой изобутил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(ff) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид)этил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(gg) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой метилбензил;

(hh) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(ii) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой фурфурил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой фурфурил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(jj) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой изобутил;

(kk) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(ll) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(mm) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-н-бутиламин; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид)этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(nn) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(oo) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой пиперонил; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(pp) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метиламин; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14}

представляет собой 1-ил-н-бутиламин; R_{15} представляет собой пиперонил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

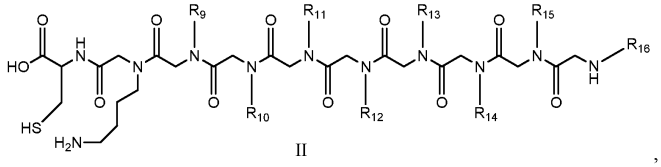
(qq) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой фурфурил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой изобутил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(rr) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой изобутил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид)этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид)этил;

(ss) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой циклогексил и R_{16} представляет собой пиперонил;

и их фармацевтически приемлемые соли.

Предпочтительно библиотека содержит соединение формулы



II

,

причем указанное соединение выбрано из группы, состоящей из соединения формулы II, причем:

(a) R_9 представляет собой n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(b) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой 1-ил-2,2-диметилэтил (изобутил); R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(c) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид)этил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(d) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(e) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой пиперонил;

(f) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изопропил; R_{12} представляет собой изопропил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил;

(g) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(h) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой пиперонил;

(i) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(j) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой 1-ил-н-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(k) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой изобутил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{12} представляет собой пиперонил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(l) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой изобутил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(m) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой фурфурил и R_{16} представляет собой фурфурил;

(n) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой фурфурил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил, и R_{16} представляет собой фурфурил;

(o) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой пиперонил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(p) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой изобутил;

(q) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(r) R_9 представляет собой метилбензил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой пиперонил и R_{16} представляет собой 1-ил-н-бутиламин;

(s) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой пиперонил;

(t) R_9 представляет собой метилбензил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой изобутил; R_{14} представляет собой 1-ил-н-бутиламин; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(u) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой 1-ил-н-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой изобутил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(v) R_9 представляет собой изобутил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой пиперонил и R_{16} представляет собой пиперонил;

(w) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой изобутил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{14} представляет собой изобутил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(x) R_9 представляет собой фурфурил; R_{10} представляет собой фурфурил; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(y) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой пиперонил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(z) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой

метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(aa) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил;

(bb) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой изобутил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой пиперонил;

(cc) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой циклогексил; R_{12} представляет собой пиперонил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(dd) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{14} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(ee) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой изобутил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(ff) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(gg) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламини R_{16} представляет собой метилбензил;

(hh) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(ii) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой фурфурил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой фурфурил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(jj) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой изобутил;

(kk) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(ll) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(mm) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой циклогексил; R_1i_5 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(nn) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(oo) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет

собой метилбензил; R_{14} представляет собой пиперонил; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(pp) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метиламин; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой пиперонил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(qq) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой фурфурил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой изобутил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(rr) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой изобутил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил;

(ss) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой циклогексил и R_{16} представляет собой пиперонил; и их фармацевтически приемлемые соли.

В одном варианте реализации настоящего изобретения указанная библиотека лигандов представляет собой библиотеку лигандов на основе бусин, включающую множество бусин, содержащих лиганды, связанные с указанными бусинами. При этом носитель может представлять собой матрицу. Данная матрица, предпочтительно, представляет собой микроматрицу, предметное стекло, планшет или чип.

Данная матрица может включать твердый носитель, имеющий поверхность; множество лигандов, связанных с указанным носителем, причем каждый из указанных лигандов включает якорный сегмент, стабильно связанный с поверхностью носителя, пептоидный сегмент и линкерный сегмент, связывающий якорный и пептоидный сегменты и находящийся между ними.

Предпочтительно матрица включает от приблизительно 1000 до 100000 различных лигандов.

Другие особенности и преимущества настоящего изобретения станут очевидны из приведенного ниже подробного описания, примеров и фигур. Вместе с тем следует понимать, что хотя подробное описание и конкретные примеры демонстрируют предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения, они приведены лишь в качестве иллюстрации, поскольку для специалиста в данной области техники на основании указанного подробного описания очевидна возможность различных изменений и модификаций в рамках настоящего изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана основная химическая схема получения библиотеки бусин Tentagel (KN1B), использованной для скрининга образцов сыворотки пациентов с болезнью Альцгеймера. На фиг. 1A показаны этапы получения, начиная с полистироловой бусины, несущей аминогруппу в качестве реагента (между бусиной и концевой аминогруппой может быть сформирован полиэтиленгликолевый или эквивалентный или альтернативный линкер). На фиг. 1B показана начальная аминокислота на бусине - метионин, который в результате последующей реакции образует соединение, показанное на фиг. B. На фиг. 1C показаны субмономеры (мономерные амины и галоуксусные кислоты), использованные для формирования библиотеки олигомерных соединений.

На фиг. 2 показана основная химическая схема получения библиотеки бусин Tentagel (JC3B), которую также использовали для скрининга образцов сыворотки пациентов с болезнью Альцгеймера. На фиг. 1A показаны этапы получения, начиная с полистироловой бусины, несущей аминогруппу в качестве реагента (между бусиной и концевой аминогруппой может быть сформирован полиэтиленгликолевый или эквивалентный или альтернативный линкер). На фиг. 1B показана начальная аминокислота на бусине - метионин, который в результате последующей реакции образует соединение, показанное на фиг. B, на фиг. 1C показаны субмономеры (мономерные амины и галоуксусные кислоты), использованные для формирования библиотеки олигомерных соединений. JC3B также использовали для скрининга сыворотки при раке поджелудочной железы.

На фиг. 3 показана основная химическая схема получения библиотеки бусин Tentagel (JC4B), использованной для скрининга образцов сыворотки пациентов с болезнью Альцгеймера. На фиг. 1A показаны этапы получения, начиная с полистироловой бусины, несущей аминогруппу в качестве реагента (между бусиной и концевой аминогруппой может быть сформирован полиэтиленгликолевый или эквивалентный или альтернативный линкер). На фиг. 1B показана начальная аминокислота на бусине - метионин, который в результате последующей реакции образует соединение, показанное на фиг. B, на фиг. 1C показаны субмономеры (мономерные амины и галоуксусные кислоты), использованные для формирования библиотеки олигомерных соединений.

На фиг. 4 показана основная химическая схема получения библиотеки бусин Tentagel (JC5B), использованной для скрининга образцов сыворотки пациентов с болезнью Альцгеймера. На фиг. 1A показаны этапы получения, начиная с полистироловой бусины, несущей аминогруппу в качестве реагента (между бусиной и концевой аминогруппой может быть сформирован полиэтиленгликолевый или эквива-

лентный или альтернативный линкер). На фиг. 1B показана начальная аминокислота на бусине - метионин, который в результате последующей реакции образует соединение, показанное на фиг. B. На фиг. 1C показаны субмономеры (мономерные амины и галоуксусные кислоты), использованные для формирования библиотеки олигомерных соединений. Мономеры JC5B включали изобутиламин, 2-метоксиэтиламин, диаминобутан, фурфуриламин, циклогексиламин, R-метилбензиламин, пипероniламин и 4-(аминоэтил)бензолсульфонамид.

На фиг. 5 показана основная химическая схема получения библиотеки бусин Tentagel (JC7B), использованной для скрининга образцов сыворотки. На фиг. 3A показаны этапы получения, начиная с полистироловой бусины, несущей аминогруппу в качестве реагента (между бусиной и концевой аминогруппой может быть сформирован полиэтиленгликолевый или эквивалентный или альтернативный линкер). На фиг. 1B показана начальная аминокислота на бусине - метионин, который в результате последующей реакции образует соединение, показанное на фиг. B. На фиг. 1C показаны субмономеры (мономерные амины и галоуксусные кислоты), использованные для формирования библиотеки олигомерных соединений.

На фиг. 6 показана схема процесса согласно настоящему изобретению для скрининга сложного биологического образца с использованием библиотеки пептоидных лигандов на основе бусин.

На фиг. 7 показаны соединения Dynabead, проявляющие активность в нормальной контрольной (NC, ЗК) сыворотке после добавления QDot к библиотеки пептоидов (JOB), изготовленной для скрининга контрольных образцов сыворотки здоровых людей и образцов сыворотки пациентов с болезнью Альцгеймера. Активные соединения удаляли, а остальные бусины, связанные с лигандом, использовали для скрининга заболевания.

На фиг. 8 показан скрининг сыворотки крови образцов пациентов с болезнью Альцгеймера на основе бусин Tentagel после удаления соединений, проявляющих активность в NC. Указанные активные соединения показаны красным цветом и представляют собой вторичное антитело Qdot, связанное с биомаркером (антителом) сыворотки, ассоциированным с заболеванием, связанным с пептоидом, присоединенным к бусине через ПЭГ-линкер.

На фиг. 9 показан тест на воспроизводимость с применением нормального контрольного образца (NC 030093) после промывки ДСН и добавления Qdot. Стрелка показывает пептоиды, связывавшиеся с NC и выбранные для секвенирования.

На фиг. 10 показан тест на воспроизводимость с применением нормального контрольного образца (NC 050047) после промывки ДСН и добавления Qdot.

На фиг. 11 показан тест на воспроизводимость с применением образца пациента после промывки ДСН и добавления Qdot.

На фиг. 12 показаны пептоидные последовательности предполагаемых активных соединений ("попаданий" или "хитов"), выбранных при скрининге на болезнь Альцгеймера из библиотеки JC3B. C-конец находится на правой стороне листа, а N-конец находится на левой стороне.

На фиг. 13 показаны химические структуры предпочтительных высокоаффинных активных соединений, полученных при скрининге болезни Альцгеймера с использованием библиотеки JC3B; показанные в этом примере структуры содержат остаток цистеина и были повторно синтезированы после определения структуры исходного активного соединения при предварительном скрининге. Библиотека JC3B содержала аналогичный пептоид, но содержавший на C-конце остаток метионина, а не остаток цистеина.

На фиг. 14 показан конкурентный анализ с высокоаффинным лигандом (ADTGI) в растворе в сравнении с ADTG-1-ADTG-42 на микроматричном носителе. Указанный конкурентный анализ показывает, что ADTGI в растворе связывался с тем же антителом, которое связывалось с пептоидами ADTG-1, ADTG14, ADTG24, ADTG25, ADTG3I, ADTG35 и ADTG40 на микроматрице. Аналогичные эксперименты выполнили с каждым из пептоидов с целью поиска четырех наборов пептоидов, связанных с четырьмя различными аутоантителами при болезни Альцгеймера.

На фиг. 15 показаны четыре группы различных пептоидов, связывающихся с различными аутоантителами при скрининге болезни Альцгеймера. В верхней части каждой группы на указанной фигуре приведены связывающиеся агенты с более высоким сродством.

На фиг. 16A показаны данные тестирования болезни Альцгеймера (слепое исследование) для пула больных с использованием пептоида PlaagI (JC3B-1), а на фиг. 16B показаны данные тестирования (слепое исследование) того же пула пациентов с БА с использованием Plaag2 (JC3B-21). Каждый пептоид представлен на микроматрице.

На фиг. 17A показаны данные тестирования болезни Альцгеймера (слепое исследование) для пула больных с использованием пептоида Plaag3 (JC3B-7), на фиг. 17B показаны данные тестирования (слепое исследование) того же пула пациентов с БА с использованием Plaag4 (3C3B-5). Каждый пептоид представлен на микроматрице.

На фиг. 18A показаны данные тестирования болезни Альцгеймера (слепое исследование) для пула больных с использованием пептоида Plaag5 (JC3B-R8), на фиг. 18B показаны данные тестирования (слепое исследование) того же пула пациентов с БА с использованием Plaag6 (JC3B-R 12). Каждый пептоид представлен на микроматрице.

На фиг. 19A показаны данные, полученные с использованием микроматриц для ADP2 в той же группе пациентов для тестов, выполненных с использованием Plaag1-6. На фиг. 19B показано сравнение данных, полученных с использованием Plaag4 и того же набора пациентов. Указанные данные демонстрируют четкую корреляцию между результатами, достигнутыми с ранее выявленным ADP2 и вновь выявленным Plaag4 в одной и той же группе пациентов.

На фиг. 20a показаны данные, полученные с использованием микроматриц для ADP3 в той же группе пациентов для тестов, выполненных с использованием Plaag1-6, на фиг. 20B показано сравнение данных, полученных с использованием Plaag2 и того же набора пациентов. Указанные данные демонстрируют четкую корреляцию между результатами, достигнутыми с ранее выявленным ADP3 и вновь выявленным Plaag2 в одном и той же группе пациентов.

На фиг. 21 показана валидация Plaag5 (предполагаемое активное соединение 5 или JC3B-R8) на бусинах TentaGel при сравнении сыворотки пациентов с БА с пулом сыворотки здоровых контрольных субъектов при концентрации 40 мкг/мл.

На фиг. 22A показаны пептоиды, связывавшиеся при скрининге рака поджелудочной железы с использованием Qdot 655 и библиотеки JC5B. На фиг. 22B и C показано подтверждение активных соединений с использованием Qdot 655 (стрелки указывают на активные соединения).

На фиг. 23 показана валидация пептоидных активных соединений для скрининга поджелудочной железы и сравнение добавления и детектирования сыворотки при заболевании с помощью Qdot 655 и добавления нормальной сыворотки.

На фиг. 24 показана валидация активного соединения путем смешивания маркеров БА и РПЖ. Полученные данные показывают, что маркер РПЖ обнаруживали при отсутствии обнаруживаемого антитела на БА-пептоидных бусинах в сыворотке при раке поджелудочной железы (сыворотка 1).

На фиг. 25 показаны последовательности соединений из библиотеки JC3B, подходящих для скрининга рака поджелудочной железы.

На фиг. 26 показаны последовательности соединений из библиотеки JC5B, подходящих для скрининга рака поджелудочной железы.

На фиг. 27A, B и C показаны результаты скрининга СКВ (волчанки). A - нормальный контроль, а B и C - сыворотка при СКВ из двух различных групп 1 и 2. Стрелки указывают на активные соединения.

Фиг. 28 показывает активные соединения для СКВ из библиотеки KN1B. C-конец находится на правой стороне листа.

На фиг. 29 показана валидация попаданий для пептоида KN1B-20. Группу 1 составляют объединенные образцы сыворотки от субъектов с заболеванием с концентрацией приблизительно 0,374 мг/мл (картинка слева)(попадания показаны красной окраской бусин). Объединенные сыворотки субъектов без заболевания (картинка в центре) использованы в концентрации приблизительно 0,378 мг/мл, а на дальней правой картинке показан контроль без сыворотки.

На фиг. 30 показано связывания/детектирование одного из активных пептоидных соединений СКВ (волчанки) с планшетами для твердофазного ИФА (ELISA) с использованием двух различных способов связывания при различных концентрациях пептоида с использованием флуоресцентной метки.

На фиг. 31 показан конкурентный анализ с иммобилизованным на планшете KN1B-20-биотин-флюоресцеина и свободным KN1B-20-биотином в растворе в различных концентрациях. Сигнал снижается по мере увеличения концентрации свободного KN1B-20-биотина, начиная с эквимолярных концентраций свободного и связанного веществ.

На фиг. 32 показан планшет для твердофазного ИФА, содержащий пептоид в различных концентрациях, изображение четко демонстрирует разницу между сывороткой больного субъекта (БА)(P столбец 1) и сывороткой здорового контроля (ряд 3) [1:200 с удвоением в каждой лунке: 1:400, 1:800, 1:1,600, 1:3200, 1:6400, 1:12800]. Стрелки указывают на разведение 1:800 в 1X буфере TBST. Концентрация пептоида в лунке составляет 10 мМ. На фиг. 32 также показана валидация платформы на бусинах TentaGel по различению между сывороткой больного субъекта и контрольной сывороткой.

На фиг. 33 показан планшет для твердофазного ИФА (ELISA) с 10 мМ ADP3 и различными разбавлениями сыворотки субъекта с БА против контрольной сыворотки. Стрелка указывает на разбавление 1:800.

На фиг. 34 показан планшет для твердофазного ИФА (ELISA) с 10 мМ SLE-KN1B-20 и различными разбавлениями сыворотки субъекта с БА против контрольной сыворотки. Стрелка указывает на разбавление 1:800.

На фиг. 35 показан график ИФА-анализа (ELISA) сыворотки БА с использованием 10 мМ ADP3, приготовленного в буфере для связывания, при различных разведениях сыворотки. Разделение между сыворотками больных и здоровых субъектов происходило в диапазоне разбавления от 1:200 до приблизительно 1:10000. Начальные разбавления составляли 1:200 (Группа 1 - сыворотка БА при 0,394 мг/мл и сыворотка субъектов без заболевания при 0,386 мг/мл).

На фиг. 36 показан график ИФА-анализа (ELISA) сыворотки СКВ с использованием 10 мМ KN1B-20, при, приготовленного в буфере для связывания, при различных разведениях сыворотки. Разделение между сыворотками больных и здоровых субъектов происходило в диапазоне разбавления от 1:200 до

приблизительно 1:10,000. Начальные разбавления составляли 1:200 (Группа 1 - сыворотка СКВ при 0,375 мг/мл и сыворотка субъектов без заболевания при 0,396 мг/мл).

На фиг. 37 показан график твердофазного ИФА (ИФА) сыворотки пациентов с СКВ с использованием 1,0 мМ KN1B-20 в ДМСО при различных разведениях сыворотки. Произошло разделение между сывороткой здоровых субъектов и пациентов в диапазоне разведений от 1:200 до приблизительно 1:10000. Исходное разведение составляло 1:200 (группа 1, сыворотка пациентов с СКВ при 0,367 мг/мл и сыворотка здоровых субъектов при 0,322 мг/мл).

На фиг. 38 показана валидация платформы FACS для бусин Tentagel.

На фиг. 39 показана степень разделения между бусинами, несущими ацетильную группу и бусинами, несущими 2,5-динитрофенильную группу (DNP) при различных концентрациях сыворотки (от 100 мкг/мл до 1000 мкг/мл) и в ответ на лечение с применением меченых вторичных антител против DNP. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) разделения была наибольшей при более высоком разведении сыворотки 1000 мкг/мл.

Фиг. 40 демонстрирует, что существует прямая конкуренция между этаноламин-DNP и связыванием DNP (на планшете) с анти-DNP антителом в концентрации 1000 мкг/мл сыворотки.

На фиг. 41 показано, что ADP3 связывал антитело к антителу из объединенных сывороток здорового контроля и объединенных сывороток БА. Эти данные демонстрируют хорошее разделение при концентрациях сывороток в диапазоне от 20 до 140 мкг/мл с использованием двух различных вторичных антител (антитела козы к АТ человека с Dylight 649 антитела козы к АТ человека с Alexa 647).

На фиг. 42 показано связанное с ADP3 аутоантитело из нормальной контрольной сыворотки и сыворотки пациентов с AD после вычитания фона в различных диапазонах концентрации сыворотки. Существует значительная степень разделения в большинстве диапазонов концентрации сыворотки от менее 20 мкг/мл до 1,20 мкг/мл или выше.

На фиг. 43 и 44 приведены структуры повторно синтезированных активных пептоидных соединений при СКВ (волчанка).

На фиг. 45 показано получение ADP3 на 10-мкм бусинах Tentagel и последующее расщепление под действием CNBr вместе с масс-спектрометрическим определением показанного лактона.

На фиг. 46 показано связанное с ADP3 аутоантитело из нормальной контрольной сыворотки и сыворотки пациентов с болезнью Альцгеймера при различных диапазонах концентрации. Бусины предварительно блокировали в течение 3 ч 1X TBST, а затем обнаруживали с применением вторичного антитела козы против антител человека, меченого Alexa 647.

На фиг. 47 показано связанное с ADP3 аутоантитело из нормальной контрольной сыворотки и сыворотки пациентов с болезнью Альцгеймера при различных диапазонах концентрации сыворотки, а также показаны значения DNP.

На фиг. 48 и 49 показано связанное с ADP3 аутоантитело из нормальной контрольной сыворотки по сравнению с антителом из сыворотки пациентов с болезнью Альцгеймера с использованием предварительного блокирования, например лизатом E. coli и лизином.

На фиг. 50 показана базовая схема приготовления и различения пептоидов, которые используются в микроматрицах в сравнении с пептоидами, которые размещали на планшетах для ИФА (ELISA). Схема получения отдельных пептоидов: отдельные бусины раздельно помещают в лунки микротитрационных планшетов и отщепляют пептоиды от бусин с получением концентрированного исходного раствора. Следует отметить, что в каждой лунке теперь находится единственный вид пептоида. Затем несколько тысяч пептоидов наносят на предметные стекла их химически модифицированного стекла таким образом, что они ковалентно связываются с поверхностью. Из одной синтетической библиотеки можно получить несколько тысяч стекол с высокой степенью воспроизводимость. ИФА получают аналогичным образом за тем исключением, что на поверхности нет цепи ПЭГ, но плотность пептоидов на планшете для ИФА может отличаться от их плотности на микроматрицах.

На фиг. 51 показаны ИФА-тесты, которые позволяют четко отличить сыворотку здорового контроля от сыворотки больного пациента при разбавлении сыворотки 1:800 с использованием пероксидазы хрена (HRP), связанной со вторичным антителом, для детектирования комплекса ассоциированного с болезнью антитела с пептоидом. Добавляют бесцветный субстрат который меняет цвет (на синий) после реакции со связанным ферментом ПХ.

На фиг. 52 показаны данные по титрованию, сравнивающие различные БА-пептоиды с помощью твердофазного ИФА при различных разведениях сыворотки пациентов (A) по сравнению с нормальной сывороткой (B). В нормальной сыворотке отсутствуют интенсивные сигналы, и имеет место четкое различие интенсивности всех БА-пептоидов по мере увеличения концентрации от 1:12800 до 1:200.

На фиг. 53 приведена диаграмма, подтверждающая корреляцию между клиническим диагнозом для немаскированного набора образцов пациентов болезнью Альцгеймера с различными стадиями (или отсутствием) БА в сравнении с данными, полученными по тем же образцам сыворотки пациента (маскированным) в результате скрининга против пептоида ADP3 для детектирования ассоциированных с болезнью антител. Приведенные результаты получены в слепом исследовании образцов плазмы из клиники Mayo в Джексонвилле (Jacksonville, США). UND=неопределенный. График получали с использованием

единственной концентрации разведения сыворотки (1:800). Результат > 1 считали положительным, результат от 1 до 0,7 считали неопределенным, а результат ниже 0,7 считали отрицательным.

На фиг. 54 приведена диаграмма, подтверждающая корреляцию между клиническим диагнозом для немаскированного набора образцов пациентов с болезнью Альцгеймера с различными стадиями (или отсутствием) БА в сравнении с данными, полученными по тем же образцам сыворотки пациента (маскированным) в результате скрининга против различных пептоидов БА (график представляет собой среднее значение результатов для 9 пептоидов) согласно настоящему изобретению для детектирования ассоциированных с болезнью антител. Приведенные результаты получены в слепом исследовании образцов плазмы из клиники Mayo в Джексонвилле (Jacksonville, США). UND=неопределенный. График получали с использованием единственной концентрации разведения сыворотки (1:800). Результат > 1 считали положительным, результат от 1 до 0,7 считали неопределенным, а результат ниже 0,7 считали отрицательным.

На фиг. 55 приведена диаграмма, подтверждающая корреляцию между клиническим диагнозом для немаскированного набора образцов пациентов с болезнью Альцгеймера с различными стадиями (или отсутствием) БА в сравнении с данными, полученными по тем же образцам сыворотки пациента (маскированным) в результате скрининга против различных пептоидов БА согласно настоящему изобретению для детектирования ассоциированных с болезнью антител. Приведенные результаты получены в слепом исследовании образцов плазмы из клиники Mayo в Джексонвилле (Jacksonville, США). UND=неопределенный. График получали с использованием единственной концентрации разведения сыворотки (1:800). Результат > 1 считали положительным, результат от 1 до 0,7 считали неопределенным, а результат ниже 0,7 считали отрицательным. Эти данные также демонстрируют действие для других деменций, в случае когда в исследовании также участвовали маркированные образцы от пациентов с умеренными когнитивными нарушениями (MCI)/депрессией, и также маркированные образцы пациентов с деменцией с тельцами Леви. Эти данные демонстрируют, что по меньшей мере у трех пациентов с MCI в образцах плазмы были определены антитела, связываемые селективными в отношении БА петоидами согласно настоящему изобретению, в количествах выше 1.

На фиг. 56A-D представлены данные от подгруппы образцов от тех пациентов, у которых были несовпадения в результатах диагностических тестов на основе пептоидов Opko Health с использованием множества пептоидов БА и клиническим диагнозом после предоставления этой информации в демаскированном виде. На фиг. 56A показаны данные для пептоида ADP3 и других в случае пациентов с клиническим диагнозом у которых, однако, результаты, полученные с пептоидом Plaag4 (Opko) были ниже 1,0 (UND в единственной точке; положительное титрование БА). Все другие пептоиды Opko были положительны по БА (т.е. выше 1.0). На фиг. 56B показано, что все пептоиды Opko были положительны в отношении ассоциированных с болезнью антител у пациентов, которые в данный момент имели диагноз "здоров" (деменция отсутствует), что указывает на предболезнь A. Фиг. 56C демонстрирует, что не один из пептоидов БА Opko не показал интенсивность выше 1 при каком-либо значении разбавления у пациента в клинически диагностированной БА, что указывает на то, что этот пациент страдает какой-то другой формой деменций.

Фиг. 56D демонстрирует, что у пациента с положительным клиническим диагнозом БА, несколько пептоидов БА Opko не дали положительных результатов по антителам, ассоциированным с болезнью, но два пептоида (Plaag6 и Plaag4) дали положительные результаты, т.е. UND в одной точке и UND даже после титрования.

На фиг. 57 приведена кластерная диаграмма, полученная по предыдущим образцам БА с использованием микроматрицы с нанесенным ADP3. Существует явная корреляция между образцами больных по сравнению со здоровым контролем в данных, полученных с использованием микроматрицы и данных, полученных с использованием платформа ИФА. На фиг. 57 также показано, что пептоид ADP3 селективен в отношении антител, ассоциированных с болезнью Альцгеймера, но не для болезни Паркинсона и волчанки (СКВ).

На фиг. 58 приведены обобщенные результаты иммуноферментного анализа (ELISA), в котором исследовали всего 106 образцов сыворотки.

На фиг. 59 приведены химические структуры Plaag7-9.

Подробное описание изобретения

В приведенном ниже подробном описании приведены многочисленные конкретные детали в целях обеспечения полного понимания изобретения. Вместе с тем специалистам в данной области техники понятно, что настоящее изобретение можно осуществить без указанных конкретных деталей. В других случаях общеизвестные способы, процедуры и компоненты не описаны в подробностях, чтобы не затруднять понимание изобретения.

Настоящее изобретение включает библиотеку лигандов и варианты их применения. В частности, настоящее изобретение включает скрининг молекул, фармакопротеомику, диагностику, лечение и другие варианты применения случайной библиотеки.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает библиотеку лигандов для пер-

сонализированной медицины. Термин "персонализированная медицина" в настоящем документе может относиться к применению теста (или диагностического средства), для идентификации лекарственного средства (или терапевтического средства), которое с наибольшей вероятностью окажет благоприятное действие на пациентов, или для выявления пациентов, которые могут подвергаться риску неблагоприятного действия указанного терапевтического средства. Перед тем, как лекарство или диагностический продукт может поступить в продажу в США и большинстве других стран, оно проходит строгую проверку на безопасность и эффективность. В случае диагностического средства для персонализированной медицины это может потребовать тестирования ткани или жидкости из организма пациентов, получавших лекарство, для выяснения наличия взаимосвязи между реакцией на лечение и присутствием конкретного маркера. Соответственно, в одном варианте реализации настоящая заявка обеспечивает способ диагностики реакции на лекарственное средство для лечения заболевания у субъекта, причем указанный способ включает: взятие биологического образца у указанного субъекта; скрининг указанного образца с использованием библиотеки лигандов; определение характеристик связывания одного или более маркеров в указанном образце с одним или несколькими лигандами в библиотеке; и определение ассоциации указанного одного или более маркеров с указанной реакцией на указанное лекарственное средство, что обеспечивает диагностику указанной реакции на указанное лекарственное средство для лечения указанного заболевания у указанного субъекта. Примеры реакции включают неблагоприятную реакцию, побочный эффект, устойчивость к лекарству и терапевтическую эффективность, включая эффективность дозировки, но не ограничиваются ими.

Неблагоприятные реакции на лекарственные средства являются основной причиной низкого процента успеха программ разработки лекарственных средств (Управление США по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) в конечном счете одобряет применение менее одного из четырех соединений, поступающих на клинические испытания на людях). Заболевания или токсические эффекты, вызванные лекарственным средством, создают для разработчиков лекарств ряд уникальных проблем, поскольку указанные реакции часто нельзя предсказать на основании доклинических исследований, они могут не обнаруживаться в ранних клинических испытаниях с участием небольшого количества субъектов. Когда такие эффекты обнаруживаются на более поздних стадиях клинической разработки, они часто приводят к прекращению программы разработки лекарственного препарата. Если лекарство одобряют, несмотря на некоторую токсичность, его клиническое применение часто сильно ограничивается возможностью возникновения нежелательных реакций даже в небольшой группе пациентов. Вероятность, что такое соединение становится терапевтическим средством первой линии, мала (только если нет конкурирующих продуктов). Клинические испытания, в которых применяют настоящее изобретение, могут обеспечить улучшенные прогнозы возможных токсических реакций в исследованиях с участием небольшого количества субъектов. Способы согласно настоящему изобретению предполагают быстрое получение прогноза вероятных токсических эффектов вмешательства в будущем. Соответственно, в еще одном варианте настоящее изобретение обеспечивает способ определения риска нежелательной реакции на лекарственное средство у пациента, причем указанный способ включает взятие биологического образца у указанного субъекта; скрининг указанного субъекта с применением библиотеки лигандов; определение характеристик связывания одного или более маркеров в указанном образце с одним или более лигандами библиотеки и определение того, связаны ли указанные один или более маркеров с указанным риском, тем самым обнаруживая указанный риск неблагоприятной реакции на указанное лекарственное средство у указанного субъекта.

Настоящее изобретение основано, в частности, на неожиданно обнаруженном факте, что комбинацию биомаркеров, связывающих пептоид, можно применять для индивидуализации терапии для пациентов. С учетом высокой изменчивости реакции на лекарственное средство разных пациентов способы анализа согласно настоящему изобретению являются особенно предпочтительными, поскольку они используют комбинаторную стратегию, учитывающую различия в характеристиках связывания множественных молекулярных детерминант (например, биомаркеров, связывающих пептоиды) для определения наличия высокой вероятности ответа заболевания у пациента на лечение конкретным лекарственным средством или комбинацией лекарств. Если пациента определяют как чувствительного, можно разработать режим дозирования для указанного пациента с целью достижения терапевтической эффективности без токсических побочных эффектов. Следовательно, пациенты, классифицируемые как чувствительные, могут получить все преимущества от лекарственной терапии, не испытывая побочных эффектов, связанных с такой терапией. Кроме того, пациенты, уже проходящие лечение лекарственным средством, могут испытывать уменьшение токсичных побочных эффектов без ущерба для терапевтической эффективности за счет регулировки последующей дозы препарата. Аналогично, можно осуществлять мониторинг пациентов, уже подвергающихся лечению лекарственным средством, с целью оценки развития устойчивости к лекарственному средству и необходимости назначения альтернативного терапевтического средства.

В результате способы согласно настоящему изобретению обеспечивают лечение заболевания у субъекта, причем указанный способ включает взятие биологического образца у указанного субъекта; скрининг библиотеки лигандов против указанного субъекта; определение характеристик связывания одного или более маркеров в указанном образце с одним или более лигандами библиотеки; определение

того, связаны ли указанные один или более маркеров с реакцией, вызванной лекарственным средством для лечения указанного заболевания; введение указанного лекарственного средства указанному субъекту на основании определенной связи между указанными одним или более маркерами и указанной реакцией, что обеспечивает лечение указанного заболевания у указанного субъекта. В еще одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает мониторинг лечения субъекта с применением лекарственного средства, причем указанный способ включает взятие биологического образца у указанного субъекта; скрининг библиотеки лигандов против указанного субъекта; определение характеристик связывания одного или более маркеров в указанном образце с одним или более лигандами библиотеки; определение того, связаны ли указанные один или более маркеров с вызванной лекарственным средством реакцией для лечения указанного заболевания; введение указанного лекарственного средства указанному субъекту на основании определения связи между указанными одним или более маркерами и указанной реакцией, что обеспечивает мониторинг лечения указанного субъекта с применением указанного лекарственного средства.

В еще одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает библиотеку лигандов для решения задач фармакопротеомики и идентификации маркеров, ассоциированных с вызванной лекарственным средством реакцией. Соответственно в одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ идентификации маркера, ассоциированного с вызванной лекарственным средством реакцией для лечения заболевания, причем указанный способ включает взятие биологического образца у субъекта; скрининг библиотеки лигандов против указанного биологического образца с; определение характеристик связывания маркера в указанном образце с лигандом в библиотеке; и определения того, связан ли указанный маркер с указанной реакцией, вызванной лекарственным средством для лечения указанного заболевания, что обеспечивает идентификацию указанного маркера, ассоциированного с указанной вызванной лекарственным средством реакцией для лечения указанного заболевания. В примере реализации вызванная лекарственным средством реакция является реакцией пациента на медикамент, его дозировку или неблагоприятной реакцией.

В одном варианте реализации одно или более предполагаемых активных соединений или предшественников биомаркеров идентифицируют с применением библиотеки лигандов согласно настоящему изобретению. Биологический образец можно получить от субъекта или множества субъектов (например, популяции или субпопуляции пациентов). В некоторых вариантах реализации первый набор биологических образцов может быть получен от множества субъектов, проявляющих реакцию (например, реакцию на лекарственное средство или на заболевание), а второй набор биологических образцов может быть получен от множества субъектов, не проявляющих реакции. С применением библиотеки лигандов можно выполнять скрининг первого и второго набора биологических образцов. Можно определить различия в характеристиках связывания одного или более маркеров с одним или более лигандами в библиотеке между первым и вторым наборами биологических образцов. На основании различий в характеристиках связывания можно идентифицировать предполагаемые активные соединения или предшественники биомаркеров. В некоторых вариантах реализации предполагаемые активные соединения или предшественники ("лиды") являются биомаркерами, распознающими аутоантитела к антигенам, ассоциированным с реакцией, например реакцией пациента на лекарство, реакцией на заболевание и реакцией на определенную стадию заболевания.

В одном варианте реализации для идентификации предполагаемых активных соединений или предшественников биомаркеров можно применять крупную библиотеку случайных пептоидных лигандов на основе бусин, содержащую пептоидные лиганды в количестве от приблизительно 350000 до приблизительно 250 млн. Предполагаемые активные соединения или соединения-предшественники биомаркеров, выявленные при начальном скрининге с применением библиотеки случайных соединений можно затем применять при последующем скрининге образцов с целью выявления диагностических средств или диагностических средств-компаньонов, обсуждаемых в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации осуществляют валидацию предполагаемых активных соединений или предшественников при последующем скрининге. В одном варианте реализации при валидации в ходе последующего скрининга можно использовать ту же библиотеку лигандов, которую использовали при начальном скрининге. В еще одном варианте реализации при валидации в ходе последующего скрининга можно использовать другую библиотеку лигандов (отличающуюся от библиотеки, использованной при начальном скрининге.

В одном варианте реализации предполагаемые активные соединения или предшественники, ассоциированные с первым признаком (например, реакцией на заболевание), выявляют при начальном скрининге, и предполагаемые активные соединения или предшественники применяют для скрининга образцов с целью определения их ассоциации со вторым признаком (например, вызванной лекарственным средством реакцией). В одном варианте реализации предполагаемые активные соединения или предшественники, ассоциированные с заболеванием, выявляют при начальном скрининге, и выявленные предполагаемые активные соединения или предшественники применяют для скрининга образцов с целью валидации и определения связи с определенной стадии указанного заболевания.

В некоторых вариантах реализации начальный скрининг для выявления предполагаемых активных

соединений можно выполнить с применением устройства на основе бусин, применяя крупную библиотеку случайных лигандов, а последующий скрининг с целью выявления диагностических средств или диагностических средств-компаньонов можно выполнить с применением любой платформы, например микроматрицы и библиотеки неслучайных или случайных лигандов.

В одном варианте реализации при последующем скрининге для выявления диагностических средств или диагностических средств-компаньонов первый скрининг можно выполнить с применением первой библиотеки лигандов, а последующий скрининг - с применением второй библиотеки лигандов, причем указанная первая библиотека лигандов содержит первый набор лигандов, а вторая библиотека лигандов содержит второй набор лигандов. В одном примере первую библиотеку лигандов подвергают скринингу для идентификации маркеров, ассоциированных с заболеванием, а вторую библиотеку лигандов подвергают последующему скринингу для идентификации маркеров, ассоциированных с вызванной лекарственным средством реакцией.

В одном из примеров предполагаемые активные соединения или предшественники применяют при первом скрининге образцов пациента, отобранных до медикаментозного лечения, с целью определения их связи с заболеванием. После медикаментозного лечения можно взять образцы у пациентов, и в одном варианте реализации те же предполагаемые активные соединения, применявшиеся в группе с предварительной обработкой, можно использовать для идентификации пациентов, находящихся на определенных стадиях заболевания или реагирующих на изменения медикаментозного лечения. В еще одном варианте реализации для мониторинга побочных эффектов лекарственных средств или последствий лечения, вызванных введением лекарственного средства и возможно коррелирующих или связанных с профилем предварительной обработки, можно применять различные предполагаемые активные соединения. В некоторых вариантах реализации для поиска дополнительных биомаркеров, которые могут быть ассоциированы с медикаментозным лечением, можно применить другую библиотеку случайных соединений.

Термин "лекарственное средство" в настоящем описании может относиться к любому лекарственному средству, включая синтетическое неорганическое или органическое соединение, белок, пептид, полисахариды и другие сахара, липиды, нуклеотидные последовательности ДНК и РНК, антисмысловой олигонуклеотид, антитело, лиганд рецептора, фермент, пептид адгезии, антиген, гормон, фактор роста, рибозим и ретровирусный вектор, но не ограничиваясь ими.

Настоящее изобретение включает любое подходящее лекарственное средство, известное в данной области техники. Указанные лекарственного средства перечислены в The Merck Index; Physicians' Desk Reference, PDR Network, 2011 Edition edition (December 1, 2010), патенте США № 7932294 и патентных публикациях США 20060046967, 20110274695, 20110269722, 20110269709 и 20060205674, все из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылок.

В одном варианте реализации лекарство выбрано из одной или более из следующих категорий/групп: Антибиотики, седативные средства, снотворные средства, антидепрессанты, нейролептики, противоманиакальные средства, анальгетики, жаропонижающие средства, агенты для лечения мигрени, противосудорожные препараты, лекарственного средства для лечения паркинсонизма и двигательных расстройств, лекарственного средства для лечения деменции, противорвотные средства, лекарственного средства для лечения головокружения, стимуляторы и активаторы ЦНС, противоинфекционные глазные препараты, противовоспалительные средства, противоаллергические препараты, лекарственные средства для лечения глаукомы, препараты для лечения глазных заболеваний, препараты для лечения заболеваний уха, назальные препараты, ротоглоточные препараты, антиаритмические препараты, антигипертензивные средства, альфа/бета-блокаторы, блокаторы каналов, ингибиторы АХЭ, антагонисты рецепторов ангиотензина II, диуретики, лекарственные средства для лечения стенокардии, нитраты, блокаторы кальциевых каналов. Лекарственные средства для лечения сердечной недостаточности и шока, сосудорасширяющие, коагулянты, антикоагулянты, тромболитики, антиагреганты, стимуляторы дыхания, противокашлевые, отхаркивающие, муколитики, противоотечные средства, антигистаминные средства, противоастматические средства; противоязвенные, антисекреторные лекарственные средства, антагонисты рецептора H.sub.2, ингибиторы протонного насоса, аналоги простагландинов, антацидные, спазмолитики, лекарственные средства, изменяющие моторику кишечника, противодиарейные, препараты против перистальтики, антимикробные препараты, препараты, действующие на желчный пузырь, мочевые противомикробные средства, диуретики, мочевые анальгетики, спазмолитики, противодиарейные лекарственные средства, действующие на уретру и влагалище, лекарственные средства, действующие на матку, лекарственные средства для лечения гипертрофии предстательной железы, альфа-блокаторы, антиандрогены, лекарственные средства для лечения эректильной дисфункции, спермицидные средства, негормональные противозачаточные средства, смягчающие вещества, кератолитики, противомикробные средства для наружного применения, противогрибковые средства для наружного применения, противопаразитарные средства для наружного применения, стероиды для наружного применения, лекарственные средства для лечения вульгарных угрей для наружного применения, лекарственные средства для лечения псориаза, нарушений пигментации и противосеборейные средства, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), ингибиторы COX-2, противоартритные агенты, иммунодепрессанты, анальгетики для наружного применения, миорелаксанты, нервно-мышечные лекарственные средства, пенициллиновые антибио-

тики, цефалоспориновые антибиотики, хинолон, фторхинолоновые антибиотики, макролидные антибиотики, хлорамфеникол, тетрациклиновые антибиотики, сульфаниламиды, средства против анаэробных микроорганизмов, метронидазол, противотуберкулезные лекарственные средства, антилепрозные лекарственные средства, противогрибковые средства, средства против простейших, антигельминтики, противоинфекционные лекарственные средства, лекарственные средства для лечения малярии, противовирусные средства, анаболики, стероиды, кортикостероиды, эстрогены, прогестагены и гормональные контрацептивы, средства против бесплодия, трофические гормоны и связанные с ними лекарственные средства, лекарственные средства для стимуляции и подавления активности щитовидной железы, противодиабетические и гипергликемические средства, витамины, аминокислоты, лекарственные средства для лечения ожирения, гиполипидемические лекарственные средства, производные фиброевой кислоты, статины, ингибиторы ГМГ-СоА-редуктазы, группа никотиновой кислоты, препараты для лечения подагры, препараты, влияющие на метаболизм костной ткани, бисфосфонаты, противораковые препараты, алкилирующие агенты, цитотоксические антибиотики, антиметаболиты, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, меркаптопурин, тиогуанин, алкалоиды барвинка, этопозид, таксаны, ингибиторы топоизомеразы 1, цитотоксические иммунодепрессанты, иммуностимуляторы, цитопротекторы, амифостин, эстрогены, прогестагены, антагонисты гормонов, противоопухолевые препараты, противоаллергические средства, неседативные антигистаминные средства, цетиризин, дезлоратадин, терфенадин, фексофенадин, седативные гистаминные препараты, блокаторы рецепторов гистамина, местные анестетики, внутривенные анестетики, ингаляционные анестетики и миорелаксанты.

В еще одном варианте реализации лекарственное средство выбрано из одного или более лекарственных средств, перечисленных в табл. 1 ниже.

Таблица 1. Выбранные примеры фирменных препаратов на рынке

Международное непатентованное название	**Торговое название**	**Показания**
Аторвастатин	Lipitor®	Холестерин
Клопидогрел	Plavix®	Атеросклероз
Этанерцепт	Enbrel®	PA, JRA, Ps, PsA, AS
Флутиказон Салметерол	Advair®	Астма
Инфликсимаб	Remicade®	PA, UC, CD, Ps, PsA, AS
Валсартан	Diovan®	Гипертензия
Ритуксимаб	Rituxan®	НХЛ, PA
Эзомепразол	Nexium®	Язва желудка
Бевацизумаб	Avastin®	Рак толстой кишки
Арипипразол	Abilify®	Шизофрения
Трастузумаб	Herceptin®	Рак молочной железы
Оланзапин	Zyprexa®	Шизофрения
Кветиапин	Seroquel®	Шизофрения
Адалимумаб	Humira®	PA, Ps, JIA, PsA, AS, CD
Монтелукаст	Singulair®	Астма
Эноксапарин	Lovenox®	Антикоагулянт, тромбоз глубоких вен
Венлафаксин	Effexor®	Депрессия
Пиоглитазон	Actos®	Диабет
Кандесартан	Atacand®, Blopress®	Гипертензия
Эсциталопрам	Lexapro®, Cipralex®	Депрессия
Глатирамер	Copaxone®	Рассеянный склероз

НХЛ неходжкинская лимфома, PA ревматоидный артрит,
JRA ювенильный ревматоидный артрит,
JIA ювенильный идиопатический артрит
PS псориаз, PsA псориатический артрит, CD болезнь Крона;
UC неспецифический язвенный колит, AS анкилозирующий спондилит.

В еще одном варианте реализации лекарство выбрано из одного или более из следующих: Абакавир, арипипразол, мышьяка триоксид, атомоксетин, аторвастатин, азатиоприн, боцепревир, брентуксимаб ведотин, бусульфан, капецитабин, карбамазепин, карисопродол, карведилол, целекоксиб, цетуксимаб (1), цетуксимаб (2), цевимелин, хлордиазепоксид и амитриптилин, хлорохин, циталопрам (1), циталопрам (2), клобазам, кломифен, кломипрамин, клопидогрель, клозапин, кодеин, кризотиниб, дапсон, дазатиниб, дезипрамин, дезлоратадин и псевдоэфедрин, декслансопразол (1), декслансопразол (2), декстрометорфан и хинидин, диазепам, доксепин, дроспиренон и этинилэстрадиол, эстрадиол, эрло-

тиниб, эзомепразол, фторурацил, флуоксетин, флуоксетин и оланзапин, флурбипрофен, флувоксамин (1), флувоксамин (2), флувоксамин (3), фульвестрант, галантамин, гефитиниб (1), гефитиниб (2), илоперидон, иматиниб (1), иматиниб (2), иматиниб (3), иматиниб (4), имипрамин, индакатерол, иринотекан, изосорбид и гидралазин, лапатиниб, леналидомид, маравирок, меркаптопурин, метопролола, мивакурий, модафинил (1), модафинил (2), нефазодон, нелфинавир, нилотиниб (1), нилотиниб (2), нортриптилин, омепразол, панитумумаб (1), панитумумаб (2), пантопразол, пароксетин, пегинтерферон альфа 2b, перфеназин, фенитоин, пимозид, прасугрел, правастатин, пропафенон, пропранолол, протриптилин, хинидин, рабепразол, расбуриказа, рифампицин, изониазид, пиразинамид, рисперидон, фенилацетат натрия и бензоат натрия, фенилбутират натрия, тамоксифен, телапревир, тербинафина, тетрабеназин, тиогуанин, тиоридазин, тикагрелор, тимолол, тиотропия, толтеродин, тозитумомаб, трамадол и ацетаминофен, трастузумаб, третиноин, тримипрамин, вальпроевая кислота, вермурафениб, венлафаксин, вориконазол, варфарин (1) и варфарин (2).

В еще одном варианте реализации настоящее изобретение включает диагностическое средство-компаньон для лекарственного средства, мишенью которого является известная мишень лекарственного средства. В еще одном варианте реализации настоящее изобретение включает диагностическое средство-компаньон для целевого лекарственного средства, которое проходит клинические испытания. Примеры целевых лекарственных средств, которые проходят клинические испытания, включают бапинейзумаб, соланезумаб, иммуноглобулин для внутривенного введения (IVIg), латрепирдин (димебон), сциллоинозит/ELND 005, метилтиониния хлорид (Rember), CERE-110, PBT2, давенутид/AL-108, BMS-708163, PF-04494700/TTP488, тидеглусиб/NP-12 (Nypta), белимумаб, атацицепт, мапатумумаб, апомаб, дуланермин, оданакатиб, AMG-785, DG-041, OC-000459, PLX-4032, LX-1031 и LX-1032, но не ограничиваются ими.

Профиль связывания одного или нескольких компонентов образца (например, биомаркеров) можно применять для прогнозирования, диагностики, оценки или лечения любого заболевания, известного в данной области техники. Термины "заболевание" или "состояние" широко известны в данной области техники и означают наличие признаков и/или симптомов у лица или пациента, которые в целом считаются аномальными. Заболевание или состояние можно диагностировать и классифицировать на основании патологических изменений. Признаки могут включать любой объективный признак заболевания, например, изменения, проявляющиеся при осмотре пациента, или результаты диагностических тестов. Симптомы являются субъективными доказательствами заболевания или состояния пациента, т.е. восприятием пациентом аномального состояния, отличающегося от нормального функционирования, ощущения или внешнего вида, что может включать, без ограничения, физическую недееспособность, заболеваемость, боль и другие изменения по сравнению с нормальным состоянием, испытываемым субъектом. Различных заболевания или состояния включают заболевания или состояния, классифицированные в стандартных руководствах по медицине, включая, без ограничения, руководства по диетологии, аллопатической, гомеопатической и остеопатической медицине, но не ограничиваются ими. В некоторых аспектах настоящего изобретения заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из видов заболеваний, перечисленных в стандартной литературе, например, Harrison's Principles of Internal Medicine, 14.sup.th Edition (Fauci et al., Eds., McGraw Hill, 1997), или Robbins Pathologic Basis of Disease, 6.sup.th Edition (Cotran et al., Ed. W B Saunders Co., 1998), или Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV, 4.sup.th Edition, (American Psychiatric Press, 1994) или других руководствах, полностью включенных в настоящий документ. Заболевания также перечислены в патентных публикациях США 2007/0003954 и 2011/0092384, полностью включенных в настоящий документ.

Примеры заболевания или состояния включают рак, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания, инфекционные заболевания, нейродегенеративные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, бактериальные инфекции, вирусные инфекции, грибковые инфекции, прионные инфекции, физиологические состояния, состояния загрязнения или состояние здоровья в целом, но не ограничиваются ими.

В способах скрининга согласно настоящему изобретению с применением библиотеки случайных лигандов можно использовать характеристики связывания для дифференцирования различных форм заболевания или состояния, включая предболезненное состояние или тяжесть болезненного состояния. Например, указанные способы можно использовать для определения метастатического состояния рака или восприимчивости к агенту или болезненного состояния. В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение включает способы и композиции для оценки лиганд-связывающих молекул, присутствующих при или ассоциированных с раком, например, не ограничиваясь ими, раком молочной железы, раком легких, раком простаты, раком шейки матки, раком головы и шеи, раком яичка, раком яичников, раком кожи, раком головного мозга, раком поджелудочной железы, раком печени, раком желудка, раком толстой кишки, раком прямой кишки, раком пищевода, лимфомой и лейкозом.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение включает способы и композиции для оценки лиганд-связывающих молекул, присутствующих при аутоиммунных заболеваниях, например, не ограничиваясь ими, миастении гравис, хроническом активном гепатите, первичном билиарном циррозе, дилатационной кардиомиопатии, миокардите, аутоиммунном полиэндокринном синдроме I типа (APS-I),

аутоиммунном гепатите, васкулитном муковисцидозе, приобретенном гипопаратиреозе, синдроме Гудпасчера, болезни Крона, ишемической болезни сердца, листовидной пузырчатке, вульгарной пузырчатке, синдроме Гийена-Барре, сахарном диабете 1 типа, синдроме скованного человека, энцефалите Расмуссена, аутоиммунном гастрите, болезни Аддисона, инсулиновом гипогликемическом синдроме (болезни Хирата), устойчивости к инсулину типа B, акантозе, системной красной волчанке (СКВ), пернициозной анемии, артрите Лайма, устойчивом к лечению, полинейропатии, рассеянном склерозе, демиелинизирующих заболеваниях, ревматизме, атопическом дерматите, аутоиммунном гипотиреозе, витилиго, офтальмопатии, связанной с щитовидной железой, аутоиммунном тиреоидите, аутоиммунном тиреоидите Хашимото, целиакии, недостаточности АКТГ, миозите, дерматомиозите, полимиозите, синдроме Шегрена, системной склеродермии, прогрессирующей системной склеродермии, очаговой склеродермии, первичном антифосфолипидном синдроме, буллезной пузырчатке, герпесе беременных, рубцующейся пузырчатке, хронической идиопатической крапивнице, синдроме соединительной ткани, некротизирующем и серповидном гломерулонефрите (NCGN), системном васкулите, бусинематозе Вегенера, синдроме Черджа-Строса, полимиозите, синдроме Рейно, хроническом заболевании печени, висцеральном лейшманиозе, аутоиммунной недостаточности C1, мембранозном пролиферативном гломерулонефрите (MPGN), повышенном времени свертывания крови, аутоиммунной тромбоцитопенической пурпуре, иммунодефиците, атеросклерозе, нейронопатии, паранеопластической пузырчатке, паранеопластическом синдроме скованного человека, паранеопластическом энцефаломиелите, подострой вегетативной невропатии, ретинопатии, ассоциированной с раком, паранеопластической опсоклонической-миоклонической атаксии, синдроме нижних мотонейронов, миастеническом синдроме Ламберта-Итона и паранеопластической дегенерации мозжечка.

В одном варианте реализации настоящее изобретение включает способы и композиции для оценки лигандсвязывающих молекул, присутствующих при инфекционных заболеваниях, например, не ограничиваясь ими, синдроме приобретенного иммунодефицита (СПИД), сибирской язве, бруцеллезе, мягком шанкре, хламидийной инфекции, холере, кокцидиоидомикозе, криптоспоридиозе, циклоспории, дифтерии, эрлихиозе, арбовирусном энцефалите, энтерогеморрагической Escherichia coli (E.coli), лямблиозе, гонорее, инфекции Haemophilus influenzae, болезни Хансена (лепре), хантавирусном легочном синдроме, гемолитическом уремическом синдроме, гепатите A, гепатите B, гепатите C, вирусе иммунодефицита человека (ВИЧ), легионеллезе, листериозе, болезни Лайма, малярии, кори, менингококковой инфекции, инфекционном паротите, коклюше, чуме, паралитическом полиомиелите, пситтакозе (орнитозе), Кулихорадке, бешенстве, пятнистой лихорадке Скалистых гор, краснухе, синдроме врожденной краснухи, сальмонеллезе, тяжелом остром респираторном синдроме (TOPC), шигеллезе, оспе, стрептококковых заболеваниях (инвазивные стрептококки группы A), стрептококковом синдроме токсического шока (STSS), Streptococcus pneumoniae, сифилисе, столбняке, синдроме токсического шока, трихинеллезе, туберкулезе, туляремии, брюшном тифе, ванкомицин-промежуточном/устойчивом Staphylococcus aureus, ветряной оспе, желтой лихорадке, варианте болезни Крейтцфельда-Якоба (vCJD), лихорадке денге, геморрагической лихорадке Эбола, эхинококкозе (альвеолярном эхинококкозе), инфекции вируса Хендра, оспе обезьян, гриппе H5N1 (птичьем гриппе), лихорадке Ласса, геморрагической лихорадке Марбург, вирусе Нипах, лихорадке о'ньонг-ньонг, лихорадке долины Рифт, венесуэльском конском энцефалите и вирусе Западного Нила.

Библиотеку лигандов согласно настоящему изобретению можно применять для скрининга любой стадии заболевания, например, ранней стадии заболевания или запущенной поздней стадии заболевания.

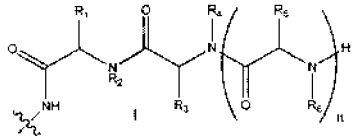
В еще одном варианте реализации настоящее изобретение включает способы и композиции для оценки лиганд-связывающих молекул, присутствующих при нейродегенеративных заболеваний, например, не ограничиваясь ими, инсульте, гиповолемическом шоке, травматическом шоке, реперфузионном повреждении, рассеянном склерозе, деменции, связанной со СПИД; нейротоксических поражениях, болезни Альцгеймера, черепно-мозговой травме, респираторном заболевании у взрослых (РДСВ), острой спинальной травме, болезни Хантингтона и болезни Паркинсона.

Настоящее изобретение включает композиции, включающие библиотеки на основе частиц, несущих соединения, выбранные из пептоидов, пептидов, олигомеров, низкомолекулярных соединений и любых молекул природного или синтетического происхождения, которые можно поместить на систему носителя, например, бусину или небольшую частицу.

В соответствии с настоящим изобретением предложены композиции, включающие пептоид(ы), связывающие антитела, являющиеся показателем реакции на лекарство, и способы детектирования антител в образце, содержащем антитела, включающие осуществление контакта антителосодержащего образца с носителем, к которому присоединен пептоид. Библиотеки лигандов могут включать соединения формулы 1, где R-группы на аминной боковой цепи или при альфа-атоме углерода независимо выбраны из группы, состоящей из атома водорода; алкила; аллила; метила; этила; н-пропила; изопропила; н-бутила; изобутила; н-бутиламина; фтор-бутила; трет-бутила; пентила; гексила; изопентила; арила; гетероарила; фуранила; индолила; тиофенила; тиазолила; имидазолила; изоксазолила; оксазолила; пиперонила; пиразолила; пирролила; пиразинила; пиридила; пиримидила; пиримидинила; пиринила; циннолинила; бензофуранила; бензотиенила; бензтриазолила; бензоксазолила; хинолина; изоксазолила; изохинолина цикло-

алкила; алкенила; циклоалкенила; фенила; пиридила; метоксиэтила; (R)-метилбензила; C_{0-6}алкиларила; C_{0-6}алкилгетероарила; C_{0-6}алкила, замещенного группой, выбранной из OH, SH, галогена, OR^{15}, $COOR^{15}$, NR^{15} (где R^{15} выбрана из группы, состоящей из H или C_{1-6}алкил или C_{1-6}алкинила) или R^{16} (где R^{16} выбрана из группы, состоящей из H или C_{1-6}алкинила); OC_{1-6}алкила; C_{2-6}алкенила; C_{2-6}алкинила; C_{2-6}алкенила; и C_{2-6}алкинила, включая одну или более химических групп, описанных в табл. 1 и 2 предварительной патентной заявки США 61/467,256, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте реализации библиотеки лигандов согласно настоящему изобретению могут включать соединение формулы 1 на носителе



где R_1 выбрана из электроноизбыточной боковой цепи Y аминокислоты;

а R_2-R_6 независимо выбраны из групп, состоящих из H, -C_1-C_6-алкила, -C_1-C_6-алкил-SCH_3; -C_0-C_6-алкил-C_2-C_6-алкенила, -C_0-C_6-алкил C_2-C_6-алкинила, -C_1-C_6-COOH, -C_1-C_6-алкил-OH, -C_1-C_6-алкил-$N(R)_2$, -C_3-C_8-циклоалкила, -C_1-C_6-алкиларила, -C_1-C_6-алкилгетероарила, -C_1-C_6-алкил-$NC(O)C_1$-C_6алкила, -C_1-C_6-алкилциклоамида, причем любая из арильных или гетероарильных групп может независимо содержать в качестве заместителей -OH, Cl, F, Br, -OCH_3, -SO_2NH_2 или -O-CH_2-O-.

Соединения библиотеки случайных лигандов (например, библиотек лигандов) для скрининга сложной биологический жидкости подробно описаны в предварительной патентной заявке США 61/467256 и 61/491717, полностью включенных в настоящий документ посредством ссылок.

Большие библиотеки лигандов согласно настоящему изобретению можно применять непосредственно при анализе биологической жидкости в соответствующих экспериментальных условиях для выявления биомаркеров, без необходимости использовать меньшее количество опорных элементов (например, примерно 100000 или менее) или переноса таких пептоидов или лигандов на микроматрицу до скрининга биологической жидкости. Кроме того, библиотеки лигандов также можно применять для скрининга рецепторов клеток, которые имеют непосредственное отношение к определенному маркеру поверхности клеток. Настоящее изобретение, в отличие от ранее известных способов, допускает включение большего количества бусин/смол и, таким образом, более крупных библиотек при скрининге агентов, связывающихся с лигандом или скрининге клеточных рецепторов для непосредственного скрининга биологических образцов сложного состава (сложных биологических образцов).

Как описано ранее по отношению к системам микроматриц, практически любую молекулу или соединение можно использовать для создания библиотек случайных соединений на основе бусин или смол. Указанные "молекулы" или "соединения" могут включать природные продукты или искусственные соединения или молекулы синтетического происхождения. Источником таких молекул могут быть биологические системы, а также источники небиологического происхождения. Предпочтительные лиганды для целей начального скрининга с помощью крупных библиотек на основе бусин в условиях, описанных в настоящем изобретении, получают, в частности, из субмономеров, выбранных из любого известного мономерного амина и из любого известного галогенида уксусной кислоты или галогенида замещенной уксусной кислоты. Например, в табл. 1 предварительной патентной заявки США 61/467256, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки, представлен широкий спектр R-групп при монозамещенном амине.

В некоторых вариантах реализации мономеры и/или субмономеры выбраны из группы, состоящей из цистеина, глицина, метионина, аллиламина, этаноламина, изобутиламина, диаминобутана, метилбензиламина (рацемического или энантиомерного), пиперониламина, циклогексиламина, 3,4-диметоксифенетиламина, бензиламина, N-(2-аминоэтил)ацетамида, N-(3-аминопропил)-2-пирролидинона, 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонамида или фурфуриламина.

В качестве субмономеров также используют галогениды уксусной кислоты и/или галогениды замещенной R уксусной кислоты, где R выбрана из любой боковой цепи аминокислоты или из любой другой группы, включая указанные группы при монозамещенных аминах. В качестве альтернативы можно осуществлять взаимодействие комбинации любого амина и любого галогенида уксусной кислоты с образованием мономера, который затем подвергают взаимодействию с другим реакционноспособным мономером в растущей цепи пептоида с образованием олигомера согласно настоящему изобретению.

Комбинаторные библиотеки пептоидов можно получить следующим образом: Пептоиды, содержащие мономерный цистеин или метионин, присоединенный к носителю или линкеру на носителе или смоле или бусине, можно получить путем первоначального добавления блокированной аминокислоты к носителю или линкеру на носителе. После добавления указанной аминокислоты (или любой желательной аминокислоты, способной служить функциональной группой или использоваться для других целей в составе олигомера или диагностического средства, содержащего указанный олигомер) можно внести оставшиеся мономеры с использованием стандартных реактивов для пептидной химии или с использованием субмономеров бромуксусной кислоты (или α-замещенной бромуксусной кислоты или аналогично-

го реагента) и монозамещенного амина, причем указанный амин замещен R-группой. R-группа может быть выбрана из любого известного замещенного пептоида, в том числе пептоидов, описанных в, например, патентных публикациях США № 2010/0303805 или 2010/0303835 и/или в различных публикациях Zuckermann и Kodadek, полностью включенных в настоящий документ посредством ссылок. Предпочтительными аминами являются амины, выбранные из библиотек, упомянутых в настоящем документе, причем определенные мономерные амины добавляют в каждую библиотеку для создания библиотек, содержащих 1-250 млн бусин или частиц смолы. Предпочтительный размер библиотеки колеблется от 1 до 50 млн бусин или частиц смолы, содержащих указанное разнообразие соединений.

Процесс изготовления каждого пептоида обычно включает (1) изготовление аминокислотного реагента на носителе (включая необязательный линкер на носителе), (2) взаимодействие аминокислоты на носителе с ацилгалогенидом, например, бромуксусной кислотой либо хлоруксусной кислотой с образованием галогенированного производного (3) взаимодействие указанного галогенированного производного с монозамещенным амином с образованием амида и (4) повторение этапов (2) и (3) с образованием пептоида. В составе крупных библиотек обычно получают метионинсодержащие пептоиды. Цистеинсодержащие пептоиды, как правило, получают при необходимости синтеза высокоаффинных пептоидов в больших количествах после первоначального скрининга крупных библиотек на основе бусин или частиц смолы. Если для первоначального скрининга сложной биологический жидкости, например, сыворотки, используют Большие библиотеки на основе бусин, то необходимость или потребность в длинном полиэтиленгликолевом линкере, который, как правило, необходим для скрининга с помощью микроматриц, отсутствует. Полиэтиленгликолевый линкер может присутствовать на бусине или частице смолы при условии, что он является коротким линкером, содержащим менее приблизительно 10 мономерных звеньев. В диагностических наборах, включающих бусины или бусины TentaGel размером менее приблизительно 50 мкм (например, 10 мкм), можно использовать как короткие линкеры ПЭГ (например, содержащие 2-10 мономеров ПЭГ), так и более длинные олигомеры ПЭГ.

При выполнении каждого этапа в процессе изготовления олигомера применяют растворители, например, ДМФ или ацетонитрил или дихлорметан. Трифторуксусную кислоту применяют для целей отщепления, а пиперидин или другое подходящее основание применяют в качестве основания в реакции между бромпроизводным и амином. При получении аминокислотного реагента применяют различные блокирующие группы. В предпочтительном варианте реализации диаминобутан применяют в качестве первого аминного субмономера в цепи, примыкающего к остатку цистеина на С-конце пептоида. На первом этапе указанного процесса выбранные бусины или частицы смолы (в количествах граммов или миллиграммов) подвергают набуханию в подходящем растворителе, например, ДМФ. Если бусины "блокированы" защитной группой при реакционноспособном амине на указанной бусине, для деблокирования бусины неоднократно добавляют щелочной раствор, например, пиперидин, с последующей промывкой ДМФ. После деблокирования бусин или при первоначальном использовании таких бусин, как бусины TentaGel, их можно подвергать взаимодействию с подходящей аминокислотой, например, цистеином или метионином (блокированной Fmoc или другой подходящей защитной группой при атоме азота, блокированной Trt (трифенилметилом) при атоме серы и в молярных количествах, достаточных для взаимодействия с каждой бусиной) в подходящем растворителе, например, ДМФ. HBTU (гексафторфосфат тетраметилурония (связующий реагент) и 4-метилморфолин (основание) вместе с блокированной аминокислотой добавляют к раствору бусин в химическом стакане (или пробирке или колбе) и встряхивают при комнатной температуре с образованием Fmoc/Trt-блокированной аминокислоты на частицах смолы (или на линкере на частицах смолы). Затем бусины несколько раз промывают в растворителе, например, ДМФ. Затем Fmoc-группу деблокируют с помощью подходящего реагента, обеспечивая реакцию амина в составе аминокислоты с другим реагентом, например, другой блокированной аминокислотой или субмономером, например, бромуксусной кислотой, и активирующим агентом, например, DIG (3-изопропилкарбодиимидом) в подходящем растворителе при нагревании (СВЧ при перемешивании). Затем полученные бусины промывают несколько раз, а затем обрабатывают желательным мономерным амином (в некотором молярном избытке) в подходящем растворителе при нагревании. Полученные бусины промывают несколько раз, а затем повторно обрабатывают бромуксусной кислотой и выбранным амином, получая олигомер и библиотеку олигомеров. Пептоиды можно отщепить от бусин с помощью трифторуксусной кислоты. Альтернативный или другой подходящий процесс получения пептоидов, включающих предпочтительный вариант реализации, например, пептоидов, содержащих цистеин, примыкающий к мономеру, содержащему 1-ил-н-бутиламин, включает получение пептоида, содержащего две аминокислоты на С-конце, посредством процесса, дополнительно включающего добавление любого из мономеров, изготовленных в субмономерном процессе, причем вторая аминокислота представляет собой лизин. Указанное дополнительно включает выбор любого мономера или субмономера с целью изготовления α-замещенных субмономеров бромуксусной кислоты, причем заместители при атоме углерода могут быть выбраны из типичных боковых цепей аминокислот с образованием, после реакции с реагентами, α-замещенных пептоидов, причем R-группа находится при одном или обоих атомах углерода пептоидной цепи или при атоме азота пептоидной цепи. Заместители при α-атоме углерода или азота

могут представлять собой практически любой заместитель, как указано в настоящем документе.

Комбинаторные библиотеки низкомолекулярных соединений можно получить коммерческим путем или изготовить с помощью способов, известных в данной области техники. См., например, Bichler et al. 1995; Cho et al., 1999; LePiae et al., 2002; Ostergaard and Holm, 1997; Yang et al., 1999). Кроме того, источниками таких молекул и библиотек являются патент США № 6344334 и публикациях Gallop et al., (1994), Gordon et al., (1994); Thompson and Eilman (1996).

Комбинаторные библиотеки пептидов можно получить коммерческим путем или изготовить с помощью способов, известных в данной области техники. См., например, Stewart and Young (1984); Tam et al. (1983); MerrifteM (1986) и Barany and Merritleld (1979), каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

Комбинаторные библиотеки нуклеиновых кислот, включая РНК или ДНК, можно получить коммерческим путем или изготовить с помощью способов, известных в данной области техники. Комбинаторные библиотеки олигосахаридов можно получить коммерческим путем или изготовить с помощью способов, известных в данной области техники.

В каждом случае "лиганды" или случайные лиганды можно добавлять к смоле или бусинам носителя, формируя библиотеки для скрининга, которые можно применять в условиях, описанных в данном описании, для скрининга биомаркеров в сложной биологический жидкости. Предпочтительными лигандами являются пептоидные лиганды.

В дополнение к изготовлению и/или применению таких библиотек, может быть необходима или желательна оценка характеристик, очистка и/или синтез или повторный синтез любого из таких лигандов. Такие способы известны в данной области техники и включают весь спектр способов очистки, например, ВЭЖХ, с помощью хроматографических средств, или способы очистки с помощью химических средств; способы оценки характеристик, например, масс-спектрометрию или ЯМР, или комбинации любых из этих способов. Дополнительное описание таких способов приведено, например, в патентной публикации США 2007/0003954, включенной в настоящий документ посредством ссылки. В таких случаях любой из таких очищенных лигандов можно называть соединением или практически очищенным соединением.

В методике начального скрининга согласно настоящему изобретению бусины и/или частицы смолы применяют в качестве носителей, содержащих олигомер, функционально присоединенный к указанному носителю. В диагностических наборах или других наборах, содержащих "активные соединения" или "предполагаемые активные соединения", полученные в таком начальном скрининге, системы носителей могут быть расширены до практически любой системы носителей, включая микроматрицы или любую другую известную диагностическую платформу. В указанных случаях необходимо обеспечить, чтобы такие наборы или другие системы носителей, содержащие указанные предполагаемые активные соединения, также содержали или были приспособлены к детектору или способу, обеспечивающему обнаружение лигандов, включающему лиганд-связывающие молекулы, присоединенные к таким лигандам. Предпочтительные способы детектирования включают, например, твердофазный ИФА или другими способы, включающие применение меченых вторичных антител.

Носители могут быть изготовлены из любого подходящего материала. Материалы, применяемые для изготовления таких носителей, могут включать, например, стекло, пластик, керамические или полимерные смолы или бусины. Носители также могут включать такие материалы, как никель, латунь, сталь или другие металлы или смеси металлов. Носители также можно кондиционировать, присоединяя к ним линкеры и/или другие средства для связывания с или присоединения к или взаимодействия с лигандом или активной группой в составе лиганда. Такие группы также описаны в патентной публикации США № 2007/0003954. В настоящем изобретении количество частиц смолы или бусин, содержащих отдельные лиганды, связанные с ними или с линкером, а затем с указанным носителем, колеблется от более 100000 до приблизительно 150 миллионов (млн). Предпочтительное количество, применяемое в способах начального скрининга согласно настоящему изобретению, составляет от 1 до 2 млн лигандов/частиц смолы.

Смолы TentaGel® являются наиболее предпочтительными для методологии крупномасштабного скрининга лигандов согласно настоящему изобретению. Эти смолы являются привитыми сополимерами, состоящими из слабосшитой полистирольной матрицы, на которую привит полиэтиленгликоль (ПЭГ или FOB). Смолы TentaGel доступны для приобретения (Rapp Polymere GmbH). Поскольку ПЭГ являются полимером-"хамелеоном" с гидрофобными и гидрофильными свойствами, привитый сополимер демонстрирует модифицированные химические свойства. По данным производителя в принципе существуют два способа внедрения ПЭГ на модифицированную полистирольную матрицу. Простейшая процедура иммобилизации представляет собой присоединение ПЭГ через одну из его концевых гидроксильных групп к хлорметилированному полистиролу в соответствии с классической методологией синтеза простых эфиров или применение других бифункциональных ПЭГ для присоединения к твердому носителю. Производитель обнаружил, что посредством последовательного присоединения ПЭГ непосредственно к матриксу путем анионной привитой сополимеризации на функционализированном сшитом полистироле иммобилизовали цепи ПЭГ с молекулярной массой до 20 кДа. Оказалось, что привитые сополимеры с цепями ПЭГ приблизительно 2000-3000 Да оптимальны по отношению к кинетической скорости, под-

вижности, набуханию и емкости смолы. Поскольку ни одна методика полимеризации не обеспечивает получения монодисперсного ПЭГ, содержащего более 10 этиленоксидных единиц, теоретически не существует способа внедрения монодисперсных цепей ПЭГ, содержащих более 10 этиленоксидных единиц, в смолу, или получения монодисперсного ПЭГ путем прямой полимеризации на полистирольном каркасе (монодисперсность определяется как ПЭГ без распределения по молекулярной массе). Указанные привитые сополимеры стабильны при давлении и могут применяться в периодических процессах, а также в условиях непрерывного потока. Указанный сополимер содержит приблизительно 50-70% ПЭГ (мас./мас.). Свойства указанных полимеров в значительной степени определяются свойствами ПЭГ и преобладают над свойствами полистирольного матрикса.

Устройство химической библиотеки или пептидной библиотеки по принципу "одна бусина - одно соединение" важна для знания количества бусин, доступных при определенном количестве смолы, а также емкости одиночной бусины. В табл. 1 приведены некоторые размеры частиц и их сопоставление с соответствующей емкостью одиночной бусины. Расчеты основаны на типичной загрузке бусин TentaGel, которая находится в диапазоне 0,25-0,3 ммоль/г. Для аналитического исследования характеристик и секвенирования на бусине должно быть по меньшей мере 5 пмоль пептида, связанного со смолой. С целью оценки оптимального количества смолы для библиотеки, которое можно обработать экономически, следует учитывать размер бусин и емкость бусин. По отношению к однородности процесса диффузии и кинетической скорости, а также для анализа и количественной оценки одиночной бусины, все бусины, использованные авторами, демонстрировали очень узкое распределение по размеру.

TentaGel NH_2	750 мкм	$4{,}62 \times 10^3$	65 нмоль
TentaGel NH_2	500 мкм	$1{,}5 \times 10^4$	19 нмоль
TentaGel NH_2	300 мкм	$6{,}4 \times 10^4$	4 нмоль
TentaGel NH_2	200 мкм	$2{,}15 \times 10^5$	1,3 нмоль
TentaGel NH_2	130 мкм	$8{,}87 \times 10^5$	280 - 330 пмоль
TentaGel NH_2	90 мкм	$2{,}86 \times 10^6$	80-100 пмоль
TentaGel M NH_2	35 мкм	$4{,}55 \times 10^7$	5,5 пмоль
TentaGel M NH_2	20 мкм	$2{,}4 \times 10^8$	1,0 пмоль
TentaGel M NH_2	10 мкм	$1{,}95 \times 10^9$	0,13 пмоль

Корреляция размера частиц, количества бусин на грамм смолы и емкости одиночной бусины. Расчет емкости одиночной бусины основан на емкости 0,25-0,3 ммоль/г смолы.

Существует несколько типов смол TentaGel, демонстрирующих заданные свойства в зависимости от их применения:

Смолы TentaGel S:

ПЭГ-спейсер присоединен к полистирольной цепи через алкильную связь. Указанная связь устойчива к действию кислот или оснований. Указанный тип смолы представляет собой смолу стандартного типа, применяемую при синтезе пептидов, твердофазном органическом синтезе или комбинаторной химии.

Смолы TentaGel PAP:

ПЭГ присоединен к полистирольному каркасу через бензильную эфирную связь. Указанная бензильная эфирная связь чувствительна к агрессивным кислотам, например, 100% ТФУК или смесям ТФУК/FMSBr.

Указанные специально разработанные смолы применяют для процедур иммунизации или для синтеза ПЭГ-модифицированных производных (продуктов, присоединенных через ПЭГ); при воздействии агрессивных кислот ПЭГ-спейсер отщепляется вместе с синтезированным соединением от твердого носителя с получением ПЭГ-модифицированных растворимых соединений в условиях твердофазного синтеза (например, ПЭГ-модифицированных пептидов).

Смолы TentaGel N:

ПЭГ-спейсер присоединен к полистирольному каркасу через бензильную сложноэфирную связь. Указанные специально разработанные смолы применяют в химии олигонуклеотидов для синтеза олигонуклеотидов в небольших и крупных масштабах. По сравнению со стеклом с регулируемой плотностью емкость увеличивается в K раз.

Поскольку смолы TentaGel являются сополимерами, состоящими из полистирола и полиэтиленгликоля, следует принимать во внимание химические и физико-химические свойства обоих исходных полимеров.

ПЭГ сам по себе является гигроскопичным полимером. Как известно из литературы, сложные эфиры ПЭГ не очень стабильны и легко гидролизуются. В зависимости от условий хранения и времени хранения ПЭГ сам по себе можно окислить по полиэфирной цепи с образованием перекоксидов или сложных эфиров. Затем обработка кислотой или основанием гидролизует образовавшиеся сложные эфиры ПЭГ, что приводит к небольшой "утечке ПЭГ". Указанную утечку моно зарегистрировать с помощью МС или ЯМР как ПЭГ и примеси в конечном продукте. Эти химические свойства присутствуют у всех ПЭГ и полимеров на основе ПЭГ.

TentaGel S:	"S" означает стандартную смолу, пригодную для широкого спектра вариантов применения, используемую в периодических и проточных системах.
TentaGel R:	Специально разработанная смола для синтеза в исследовательских целях. Смола демонстрирует повышенный объем при набухании, но менее устойчива к давлению. Хорошо подходит для синтеза крупных пептидов и проблемного синтеза.
TentaGel HL:	Этот вариант TentaGel с высокой загрузкой объединяет существенно повышенную емкость с достоинствами смол TentaGel
TentaGel MB:	Макробусины TentaGel выделяются необычно большим диаметром и высокой емкостью частиц, основанной на технологии TentaGel, и предназначены для синтеза на одиночной бусине и анализа одиночных бусин.
TentaGel N:	Смола этого типа предназначена для автоматического крупномасштабного синтеза олигонуклеотидов.
TentaGel J:	Смола этого типа разработана для полимерных иммуноконъюгатов.
TentaGel M:	Микросферическая форма частиц этой смолы TentaGel размером 10, 20, 30 мкм и ее монодисперсность обеспечивает применение в автоматических сортировщиках, для создания очень крупных библиотек, высокоскоростного синтеза и т.д.
TentaGel B:	Описывает бифункциональные смолы TentaGel, в которых реакционноспособные сайты на внешней поверхности бусин перпендикулярны реакционноспособным сайтам во внутреннем объеме бусин, а также гибридные смолы для последовательного отщепления.

В дополнение к бусинам TentaGel, для получения библиотек типа "один лиганд на бусину" можно применять другие смолы и/или частицы. Например, можно применять слабосшитые полистирольные смолы или полиамидные смолы. Группа, соединяющая подложку с бусиной смолы, может представлять собой неотъемлемую часть твердофазного синтеза. Линкер представляет собой специализированную блокирующую группу, в том смысле, что большую часть времени линкер связывает функциональную группу только для того, чтобы она появилась в конце синтеза. Линкер не должен быть подвержен действию реагентов, применяемых для модификации или удлинения присоединенного соединения. И, наконец, этап отщепления должен протекать быстро и с хорошим выходом. Лучший линкер должен обеспечивать присоединение и отщепление с количественным выходом.

В некоторых аспектах, носитель может представлять собой бусину, планшет, тест-полоску, фильтр, мембрану, стержень или лунку. Обнаружение может включать РИА, ФИА, твердофазный ИФА, вестерн-блоттинг, проточную цитометрию, FRET или поверхностный плазмонный резонанс.

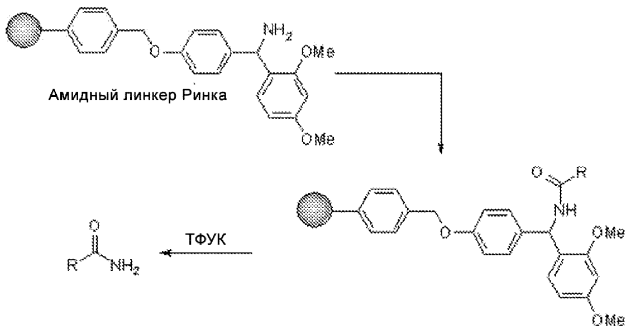
Карбоксильные линкеры

Первая линкерная группа, использованная для синтеза пептидов, носит имя родоначальника твердофазного синтеза. Смола Меррифильда представляет собой сшитый полистирол, модифицированный хлорметильной группой. Карбонильная группа присоединена путем нуклеофильного замещения хлорида карбоксилатом цезия в ДМФ. Расщепление для регенерации карбоновой кислоты обычно осуществляют с помощью фтористого водорода.

Второй класс линкеров, применяемых для карбоновой кислоты, представляет собой линкер Ванга. Указанный линкер обычно присоединяют к сшитому полистиролу, TentaGel и полиакриламиду, получая смолу Ванга, разработанную для синтеза пептидных карбоновых кислот с использованием стратегии Fmoc-блокирования, и в связи с принципом использования активированного бензилового спирта продукт-карбоновую кислоту можно отщеплять с помощью ТФУК. Разработана более кислотолабильная форма смолы Ванга. Смола SASRIN обладает структурой, аналогичной линкеру Ванга, но с добавлением метоксигруппы для стабилизации иона карбония, образующегося при кислотном отщеплении.

Карбоксамидные линкеры

Линкер Ринка обычно предпочтителен для получения первичного карбоксамида при твердофазном синтезе; в настоящем изобретении этот линкер применяют при производстве или повторном синтезе активных соединений или предполагаемых активных соединений, полученных при первичном скрининге согласно изобретению. В таких случаях цистеин является первым мономером, взаимодействующим с линкером Ринка, а затем процесс включает либо добавление следующего мономера для получения олигомера, либо последующего субмономерного реактива для получения олигомера. Повышенная чувствительность линкера Ринка к кислоте является следствием двух дополнительных электронодонорных метоксигрупп. При получении первичного карбоксамида исходный материал присоединяют к линкеру в виде карбоновой кислоты и после синтеза отщепляют от смолы с помощью ТЭА.



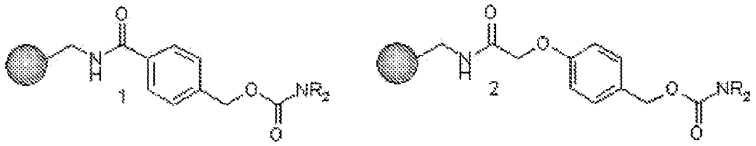
После применения смолы Ринка для получения карбоксамида следует катализируемое ТФУ кислотой отщепление.

Спиртовые линкеры

Гидроксильный линкер на основе тетрагидропиранильной (THP) блокирующей группы разработан Thompson and Ellmann. Все виды спиртов легко присоединяются к дигидропирану, и полученная THP-защитная группа устойчива к действию сильного основания, но легко расщепляется кислотой. Этот линкер присоединяют к смоле Меррифильда. Тритильная группа является хорошей кислотолабильной защитной группой для большого количества гетероатомов. Тритильную группу использовали для присоединения спиртов при синтезе библиотеки β-меркаптокетонов.

Карбаматный и аминный линкер

Карбаматный линкер использовали для синтеза комбинаторной библиотеки из 576 полиаминов, изготовленной при поиске ингибиторов трипаносомных паразитарных инфекций. Исследовали два линкера. Один из них был основан на гидроксиметилбензойной кислоте 1, а к другому была добавлена электронодонорная группа 2. Последний линкер обеспечивал отщепление с помощью ТФУК, в то время как первый мог расщепляться в агрессивной кислой среде.



Очень полезный линкер разработан недавно для получения третичного амина. (Третичные амины часто используют в молекулах лекарств.) Первичные и вторичные амины внедряют в линкер путем реакции Майкла. Амин можно алкилировать с получением иона четвертичного аммония, связанный со смолой. В умеренно щелочных условиях происходит элиминирование Хоффманна с получением третичных аминов высокой чистоты.

Бесследные линкеры

В некоторых случаях исходные материалы загружают на смолу в одной из форм, например, в виде карбоновой кислоты, а отщепляют в другой форме, например, карбоксамида. Это в особенности приемлемо, если для соединения-мишени требуется функция высвобождения. (Пептиды неизменно содержат карбоновую кислоту или карбоксамид). В то же время рост интереса к комбинаторным библиотекам низкомолекулярных соединений, не являющихся пептидами, выявил необходимость в линкерах нового типа. Указанные линкеры проявляют неспецифические функции после расщепления. Бесследные линкеры называются так потому, что анализ конечного соединения не обнаруживает следа присоединения к твердой фазе.

Образцы

Как обсуждалось ранее, биологические жидкости сложного состава, подготовленные для анализа в процессе согласно настоящему изобретению, включают или могут включать множество потенциальных биомаркеров, включая маркеры, экспрессирующиеся на клетках (неадгезивных клетках, в том числе Т-клетках или других иммунных эффекторных клетках), микроорганизмы, белки, пептиды, липиды, полисахариды, низкомолекулярные соединения, органические молекулы, неорганические молекулы, биологические молекулы, и в том числе любые обнаруживаемые или регистрируемые молекулы в такой среде сложного состава. В предпочтительном варианте реализации такие маркеры представляют собой антитела, и, в частности, являются антителами, синтезированными в результате заболевания или состояния. В предпочтительном варианте реализации источником таких маркеров являются физиологические жидкости, например, сыворотка, плазма, слюна или другие жидкости или образцы, полученные от пациента или животного или организма. Каждый образец или ткань или биологический образец или образец, происходящий из окружающей среды, или полученный образец кондиционируют или обрабатывают или разбавляют, или иным способом подготавливают для начального скрининга либо любого последующего скрининга указанного образца с применением предполагаемых активных соединений или лигандов, обладающих сродством к таким биомаркерам. Образцы разводят в соответствии со способами, приведенными здесь, с целью обеспечить или допустить достаточное различие между фоновыми уровнями или

шумом и сигналами, ассоциированными со связыванием лиганда с лиганд-связывающей молекулой.

Время и/или условия, необходимые для воздействия лигандов/носителей на такие образцы, зависят от конкретного образца и других факторов. Предпочтительные условия для процесса согласно настоящему изобретению дополнительно описаны в данном документе. Почти во всех случаях после воздействия биологической жидкости на крупную библиотеку лигандов и/или лиганды или наборы, полученные из такой библиотеки, применяют этапы промывки или элюирования и другие средства кондиционирования. Применяют водные растворы, в том числе буферные растворы, например, HEPES-буфер, Iris-буфер или физиологический раствор с фосфатным буфером. Системы носителя также можно обработать энергопоглощающими материалами для облегчения десорбции или ионизации "комплекса" с поверхности носителя. Кроме того, применяют химические средства для отсоединения или удаления комплексов "лиганд - лигандсвязывающая молекула" с носителя.

Способы детектирования комплексов "лиганд - лигандсвязывающая молекула" на носителе включают фотометрические и не фотометрические способы. Такие способы включают обеспечение того, что указанный процесс включает способ для детектирования и измерения поглощения, флуоресценции, показателя преломления, поляризации или светорассеяния. Сюда относятся прямые и/или косвенные средства для измерения таких параметров. Способы, использующие флуоресценцию, включают применение флуоресцентных маркеров в иммунологических способах, например твердофазном ИФА или сэндвич-анализе. Способы, использующие показатель преломления, включают поверхностный плазмонный резонанс (SPR), способы использования дифракционных решеток (например, сенсоры с однородным решеточным выводом, оптические сенсоры с опросом по длине волны (WIOS) и дифракционные решетки с линейно меняющимся периодом), резонансное зеркало и интерферометрические методики. Способы, использующие поляризацию, включают эллипсометрию. Кроме того, можно использовать способы на основе светорассеяния. Другие средства для мечения и/или разделения и/или детектирования могут также включать магнитные средства. Можно применять магнитно-резонансную томографию, ионную спектрометрию в газовой фазе, МРТ.

Анализ полученных данных, как правило, включает количественную оценку сигнала, обусловленного обнаруженным биомаркером, по сравнению с контролем или эталоном. Указанные данные можно анализировать с помощью любого подходящего средства. Для сбора и анализа данных можно применять компьютеры и компьютерные программы. Бусины и/или другие носители можно кодировать с помощью компьютера в целях идентификации. Анализ данных включает анализ интенсивности сигнала в условиях данного анализа или способа детектирования. Лиганды, лиганд-связывающие молекулы или эталонные молекулы и/или молекулы для вторичного детектирования можно метить радиоактивной меткой или обнаруживаемой молекулой. Специалист в данной области техники может оценить различия и/или отличие между образцами биологической жидкости, содержащими биомаркеры, ассоциированные с заболеванием, и контрольными образцами или образцами от здорового пациента, которые не содержат таких маркеров. Специалист в данной области техники также может определить, в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, наличие ложноположительных или других активных соединений, которые являются или могут обнаруживаться в контрольных образцах для учета и/или удаления таких активных соединений, и специалист в данной области техники может, в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, продолжить процесс определения или поиска биомаркеров, ассоциированных с заболеванием, в образцах от пациентов с указанным заболеванием или состоянием. "Детектирование" таких активных соединений во всех случаях осуществляют с помощью средства для определения связывания лиганд-связывающей молекулы, например биомаркера, ассоциированного с заболеванием, или другого маркера, с лигандами в библиотеке лигандов, например, описанной в настоящем документе.

Биомаркеры, ассоциированные с заболеваниями и/или состояниями, приведенными в настоящем документе, варьируют в зависимости от конкретной стадии заболевания и/или состояния конкретного пациента или животного или другого исследуемого организма. В большинстве случаев ожидается, что лиганды, являющиеся предполагаемыми активными соединениями и соединениями, приведенными здесь, имитируют природный антиген, в первую очередь инициирующий иммунный ответ и/или образование антител или иммунных клеток. Настоящее изобретение и процесс скрининга, приведенные в настоящем документе, не требуют знания конкретного антигена или антитела, генерируемых в ответ на антиген. В то же время лиганды могут быть полезны сами по себе в качестве вакцин или лекарств-кандидатов в дополнение к применению при скрининге и в диагностических способах, приведенных в настоящем документе. Таким образом, настоящее изобретение включает соединения и фармацевтические композиции.

Скрининг пептоидов

Для скрининга пептоидной комбинаторной библиотеки "одна бусина - одно соединение" (OBOC) получают от десятков тысяч до миллионов бусин, несущих пептоиды, а затем смешивают их с биологическим образцом сложного состава. Начальный биологический образец сложного состава предпочтительно является контрольным образцом, а последующий биологический образец сложного состава, обработанный библиотекой лигандов после "удаления" из нее контрольных активных соединений, затем об-

рабатывают и/или подвергают скринингу с биологическим образцом сложного состава больного. Затем обнаруживают, идентифицируют и выделяют и/или оценивают характеристики лигандов/бусин, взаимодействующих по меньшей мере с одним биомаркером, ассоциированным с заболеванием. В предпочтительном варианте реализации применяют протокол скрининга Tentagel, включающий (1) получение бусин, (2) скрининг сложной биологический жидкости и (3) обнаружение активных соединений.

Скрининг пептидов

Для скрининга пептидной комбинаторной библиотеки "одна бусина - одно соединение" (OBOC) получают от десятков тысяч до миллионов бусин, несущих пептиды, а затем смешивают их со биологическим образцом сложного состава согласно процессам, описанным в настоящем документе. Затем идентифицируют и выделяют бусины, взаимодействующие с биомаркером, ассоциированным с заболеванием, для определения структуры соединения. Например, можно выполнить скрининг с помощью OBOC-библиотеки пептидов с использованием стрептавидина (SA) в качестве белка-зонда, меченого красным флуоресцентным красителем, и с применением оборудования для проточной сортировки COPAS BIO-BEAD для отделения флуоресцентных бусин от нефлуоресцентных. См. Manmi et al., J. Comb. Chein, 2009, 11 (1), pp 146-150. Красные красители, которые можно применять, представляют собой ATTO 590 и Texas Red. После инкубирования библиотеки с конъюгатом SA-красный флуоресцентный краситель получают положительные бусины, обусловленные взаимодействием пептид-SA. Бусины анализируют времяпролётной масс-спектрометрией с ионизацией лазерной десорбцией и использованием матрицы (MALDI-TOF MS). Таким образом, пептидные библиотеки можно использовать аналогично описанному в настоящем документе способу с применением пептоидов, причем первоначальный контроль образцов биологической жидкости используют для удаления лигандов/бусин активных соединений из исходной библиотеки соединений, а затем используют оставшиеся члены библиотеки для скрининга любых активных соединений в образце сложной биологический жидкости, взятой у больного. Указанные активные соединения являются предполагаемыми активными соединениями, дальнейшую обработку которых осуществляют с применением любых диагностических наборов.

Аналогично, любой лиганд можно подвергать скринингу с применением бусин или носителей и процессов, описанных в настоящем документе Указанные лиганды включают, в дополнение к пептоидам или пептидам, нуклеиновые кислоты, олигомеры, полисахариды, низкомолекулярные соединения и/или любую их комбинацию, которую можно встроить в библиотеки и использовать использовали для скрининга сложной биологический жидкости в условиях, приведенных в настоящем документе.

Наборы и средства диагностики

Любое из соединений или композиций, описанных здесь, можно в дальнейшем применять в диагностических наборах в клинических или лабораторных условиях. Указанные наборы могут варьироваться от простых диагностических анализов, осуществляемых на месте, до сложных и многоканальных инструментов или зондов. Системы носителей и "упаковка", окружающая внутреннюю часть системы носитель/лиганд, могут быть выбраны из современных коммерческих наборов, предназначенных для включения предполагаемых активных соединений и/или повторно синтезированных активных соединений, установленных на таких подходящих платформах, либо их можно применять в диагностических наборах новой конструкции. Комплекты, как правило, снабжены всеми подходящими реагентами и инструкциями по применению наборов для скрининга и/или диагностики конкретного заболевания или состояния согласно назначению набора. Любой такой набор или способ включает по меньшей мере одно предполагаемое активное соединение или лиганд, идентифицированный в соответствии со способом скрининга, приведенным в настоящем документе. Указанный лиганд или множество лигандов можно выбрать из того же лиганда или смеси лигандов, которые включают соединения согласно настоящему изобретению. Указанные лиганды можно выбрать на основании их сродства к биомаркеру, ассоциированному с одним конкретным болезненным состоянием или группой или категорией заболеваний или состояний. Предпочтительными лигандами являются пептоидные лиганды. Наборы также могут содержать инструкции для врачей, диагностирующих конкретное заболевание или состояние, и специфические этикетки для определенного набора и болезненного состояния. Таким образом, настоящее изобретение включает комбинацию комплекта, включающего все необходимые компоненты, например, предполагаемые пептоиды или лиганды, обнаруженные при начальном скрининге с использованием любой из библиотек, описанных в настоящем документе и/или известных в соответствии с конкретными способами, приведенными здесь, и инструкций и этикеток. Кроме того, предполагается, что конкретные процессы, способы и материалы, описанные в настоящем документе, можно применять в клинических и лабораторных условиях под наблюдением квалифицированного оператора. Наборы и/или инструменты или оборудование включают лиганды, например, пептоиды, специфические для антител и/или клеток, ассоциированных с заболеванием. "Набор" может включать полный диагностический набор и/или набор для скрининга, либо "набор" может включать компоненты или субкомпоненты, содержащие или включающие диагностические пептоиды, антитела, обнаруженные и охарактеризованные посредством таких пептоидов, или нативные антигены, обнаруженные и очищенные и/или охарактеризованные в результате взаимодействия с аутоантителом. Такие антитела и очищенные антигены составляют часть настоящего изобретения.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает набор для диагностики заболе-

вания. В еще одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает набор для лечения заболевания. Набор может включать библиотеку лигандов, реагенты для детектирования и скрининга биологического образца с помощью библиотеки лигандов, адъюванты для скрининга и вкладыш. Вкладыш может включать инструкции для выполнения этапов диагностики, инструкции для определения введения лекарственного средства и инструкции по введению лекарственного средства на основе определения. В некоторых вариантах реализации набор может включать вкладыш в упаковку, представляющий собой этикетку, утвержденную FDA или органом по одобрению лекарств в других странах.

Библиотеки лигандов согласно настоящему изобретению применяют для поиска и определения лигандов, связывающихся с биомаркерами, ассоциированными с заболеванием. Такие лиганды затем используют в наборах и/или способах, в целом описанных выше, для оценки, скрининга или диагностики болезненных состояний. Указанные диагностические способы обычно включают скрининг и поиск биомаркеров, ассоциированных с заболеванием, которые включают антитела и/или другие биологические маркеры. Как указано выше, эти антитела можно дополнительно идентифицировать и исследовать с использованием лигандов согласно настоящему изобретению на подходящих колонках для выделения или удаления таких антител из образцов крови. Указанные антитела можно, в свою очередь, использовать в качестве зондов для детектирования нативного антигена, связанного с таким антителом. Таким образом, настоящее изобретение включает как антитела, так и очищенные антигены, связанные с такими антителами, и обнаруженные, выделенные и охарактеризованные с применением способов согласно настоящему изобретению.

Наборы и/или другие средства для скрининга и/или диагностики болезненных состояний следует, в первую очередь, оценивать по образцам, взятым у пациентов. Указанные образцы, взятые у пациента, могут происходить от нормальных контрольных образцов или образцов от пациента, где у указанный пациент болен или у которого подозревают указанное заболевание или состояние. У пациента могут быть другие симптомы, связанные с заболеванием, кроме "присутствия" биомаркера, ассоциированного с заболеванием. Пациент может находиться на ранней стадии заболевания, может вообще не страдать заболеванием или состоянием, или может находиться на поздней стадии конкретного заболевания. В любом клиническом контексте и в рамках соответствующих руководств контрольные образцы, образцы от пациента и клинические образцы можно представить в соответствии со слепым принципом, а затем оценить с помощью соединений согласно настоящему изобретению. Данные, полученные в результате скрининга, можно анализировать после раскрытия с целью поиска статистически значимых результатов или корреляций с известными или базовыми данными о любом конкретном пациенте или группе пациентов. Настоящее изобретение включает способ скрининга на присутствие заболевания или состояния, включающий в себя (1) скрининг биологического образца от пациента с применением по меньшей мере одного соединения согласно настоящему изобретению: (2) скрининг контрольного биологического образца при тех же условиях с применением по меньшей мере одного соединения, и (3) сравнение контрольных данных здорового субъекта с данными для пациента с целью определения наличия или отсутствия биомаркера, ассоциированного с заболеванием. Группу пациентов и образцов от пациентов, которые больны или у которых подозревают заболевание X, можно подвергнуть скринингу с применением набора или диагностического зонда, содержащего по меньшей мере одно соединение согласно настоящему изобретению, а данные, полученные по каждому пациенту, можно использовать в зависимости от конкретного случая с целью подтверждения или валидации болезненного состояния или отсутствия такового. Такие данные, полученные согласно настоящему изобретению, можно использовать в сочетании с полной известной информацией о конкретном пациенте с целью оценки состояния пациента, а также обеспечения указаний для врача, назначающего лечение. "Информацию", полученную в результате любого такого скрининга, можно использовать при клинических испытаниях для оценки отдельных пациентов, получающих медикаментозное лечение. Таким образом, настоящее изобретение включает способ оценки хода клинических испытаний, включающий применение скрининга, выполненного в соответствии со способами, описанными в настоящем документе. В предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу скрининга или диагностики раннего болезненного состояния, включающему использование скрининга или соединения, приведенного в настоящем документе, для детектирования биомаркера, ассоциированного с заболеванием. Настоящее изобретение особенно полезно в контексте раннего вмешательства в ход заболевания, причем обнаружение таких биомаркеров, как ожидается, станет возможным задолго до агрессивного прогрессирования заболевания. В еще одном контексте ожидается, что раннее вмешательство в ход сердечно-сосудистого заболевания и/или метаболического заболевания, а также неврологического заболевания спасет жизни и предотвратит или сможет использоваться для предотвращения дальнейшего развития таких заболеваний без раннего медицинского вмешательства или лечения.

Настоящее изобретение также включает способы повышения разрешения или эффективности различий между контрольным или стандартным раствором и биологической жидкостью сложного состава, содержащей биомаркер, ассоциированный с заболеванием. Например, способы включают в себя предварительную подготовку или предобработку или предварительное блокирование системы/сыворотки буферами и/или кондиционирующими агентами, например лизатом E.coli и/или лизином.

В еще одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ лечения субъекта, предположительно страдающего от заболевания, включающий (a) обеспечение контакта образца, содержащего антитело, от указанного субъекта с одним или более носителями, присоединяющими к нему пептоид, включающий пептоид формул, приведенных в настоящем документе (b) обнаружение антител, связанных с указанными пептоидами, и (c), формирование решения по лечению на основании результатов шага (b). Способ может дополнительно включать получение указанного образца от субъекта. Способ может также дополнительно включать постановку диагноза заболевания для субъекта, от которого получен указанный образец, если уровень антитела, связывающегося с пептоидом, больше, чем уровень антитела, наблюдаемый для контрольных здоровых пациентов. Способ может также дополнительно включать формирование решения по лечению для указанного субъекта. Образец можно приводить в контакт более чем с одним пептоидом формул, приведенных в настоящем документе. Образец можно приводить в контакт с многоканальной платформой для целей диагностики множественных болезненных состояний. Носитель может представлять собой бусину, планшет, тест-полоску, фильтр, мембрану, стержень или лунку. Образец может представлять собой кровь, сыворотку, слюну или ЦСЖ. Обнаружение может включать РИА, ФИА, твердофазный ИФА, вестерн-блоттинг, проточную цитометрию, FRET или поверхностный плазмонный резонанс.

Еще один вариант реализации направлен на композицию антител, выделенных из биологической жидкости, являющихся показателем заболевания; в некоторых вариантах реализации указанные антитела выделены путем контакта образца, содержащего такие антитела, с пептоидной композицией, специфически связывающейся с антителами, являющимися показателем заболевания или ассоциированными с заболеванием. Антитела можно удалить, выделить или очистить от других компонентов, не являющихся антителами, и не-D специфических компонентов. Затем антитела можно промыть и/или отделить от агентов, захватывающих пептоиды.

В некоторых вариантах реализации матрицу с пептоидами, изготовленную из пептоидов, обнаруженных с применением способа, описанного здесь, гибридизуют с биологическим образцом, включающим добавку бактериального лизата, например, лизата E.coli. Биологический образец включает контрольный образец и образец, содержащий маркер расстройства центральной нервной системы. Например, стекла микроматриц покрывают камерой для гибридизации и уравновешивают 1XTBST (50 мМ Трис, pH 8,0; 150 мМ NaCl, 0,1% Твин-20) в течение приблизительно 15 мин. Затем стекла блокируют бактериальным лизатом при концентрации по меньшей мере не превышающей, или приблизительно равной 0,5, 1, 1,5, 2 мг/мл лизата. Лизат удаляют, а предметные стекла инкубируют приблизительно с миллилитром биологического образца (содержащим приблизительную концентрацию белка 5, 10, 15, 20 или 25 дг/мл, включая все диапазоны и значения между ними) в бактериальном лизате при осторожном встряхивании. Затем микроматрицы промывают 1XTBST и гибридизуют с меченым антителом против IgG (например, при разведении 1:400). Затем стекла промывают соответствующим буфером. Стекла высушивают с использованием центрифуги (например, 5-мин центрифугирование при 1500 об/мин) и сканируют на сканере микроматриц, например, с использованием 635-нм лазера при 100% мощности и усилении трубки фотоумножителя 600 или 650. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу снижения фонового шума антисывороток в диагностическом тесте, включающему обработку контрольного образца плазмы и образца от больного лизатом E.coli и обеспечение контакта указанных образцов с матрицей пептоидов или лигандов. Считается, что этот процесс можно использовать для обработки носителя любой матрицы, используемой для детектирования и различения антител в сыворотках в контексте сравнения контрольного образца и образца от больного.

Предполагается, что любой способ или композицию, описанные в настоящем документе, можно осуществить по отношению к любому другому способу или композиции, описанным в настоящем документе.

Использование форм единственного числа в сочетании с термином "включающий" в формуле изобретения и/или описании может означать "один", но также согласуется со значением "один или более", "по меньшей мере один" и "один или более одного".

Предполагается, что любые варианты реализации, рассмотренные в данном описании, можно осуществить по отношению к любому способу или композиции согласно настоящему изобретению, и наоборот. Кроме того, композиции и наборы согласно настоящему изобретению можно применять для осуществления способов согласно настоящему изобретению.

В данной заявке термин "приблизительно" используется для указания того, что значение включает изменения, обусловленные внутренней ошибкой устройства, способа, используемого для определения указанного значения, или изменчивость, существующую среди подопытных субъектов.

Понятно, что любое из предполагаемых активных соединений или пептоидов, обнаруженных в ходе процесса, приведенного в настоящем документе, также может являться терапевтическим лекарственным средством или вакциной-кандидатом. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу для детектирования лекарств-кандидатов или вакцин, включающему использование скрининга в соответствии со способами, описанными в настоящем документе.

Следующие примеры приведены с целью более полной иллюстрации предпочтительных вариантов

реализации изобретения. В то же время, их не следует рассматривать в качестве ограничений для рамок изобретения.

Примеры

Пример 1: Получение библиотеки

Протокол синтеза пептоидов (цистеин-пептоидов или метионин-пептоидов)

В следующем примере продемонстрировано получение библиотек пептоидов согласно настоящему изобретению. Материалы, используемые в примере, включали химические колбы или стаканы, пластиковые пробирки, 10-15 3-мл шприцов с иглами. Латексные перчатки, 10-15 15-мл полипропиленовых пробирок и микропипетки с наконечниками, устойчивыми к действию растворителей (1000 мкл), стеклянные пипетки и бусины из смолы. Использованные химические вещества и/или реагенты включали N,N-диметилформамид, бромуксусную кислоту (BMA), безводный диметилформамид, пиперидин, ацетонитрил, 3-диизопропилкарбодиимид (DIC), трифторуксусную кислоту, 5(6)-карбоксифлуоресцеин, дихлорметан (ДХМ) и 4-метилморфолин (NMM). При изготовлении каждой библиотеки также применяли различные амины, а также HBTU (гексафторфосфат тетраметилурония) и триэтилсилан.

Получение пептоидов

Концентрацию каждого амина, используемого в процессе, вычисляли с использованием следующей формулы: V-FW/d/1000×2M×5 мл

Процедура:

Этап 1: Набухание бусин смолы

(a) 250 мг бусин смолы помещали в чистую сухую реакционную колбу, добавляли к бусинам 5 мл водного ДМФ и оставляли набухать в течение часа или менее. Затем бусины несколько раз (2 или 3 раза) промывали ДМФ в вакууме.

Этап 2:

Этапы (b), (c) и (d) пропускали с использованием "неблокированных бусин" (например, Tema~Gel).

20% раствор пиперидина (основание) с использованием безводного ДМФ в качестве растворителя использовали в следующем процессе:

Следующий способ, включающий этапы (b), (c) и (d), осуществляли 2 раза с использованием "блокированных бусин".

(b) К блокированным бусинам добавляли 2,5 мл 20% раствора пиперидина;

(c) После добавления пиперидина реакционную колбу помещали на качалку/инкубатор в течение 20 мин при 200 об/мин и 25°C.

(d) Реакционную колбу промывали 8-10 раз 5 мл водного ДМФ. Кроме того, получали следующие растворы:

468 мг Fmoc-Cys(Trt)-OH в безводном ДМФ (объем 2 мл) (раствор A). 161,6 мг NMM в 2 мл безводного ДМФ 303,2 мг HBTU добавляли во флакон с NMM (раствор B).

Добавление HBTU/HMM и Fmoc-Cys

1 мл раствора A и раствора 8 добавляли к бусинам - (HBTU/NMM) и Fmoc-Cys (Trt)-OH) и встряхивали в течение 1 ч.

Бусины промывали в ДМФ 5-10 раз.

К бусинам добавляли оставшийся 1 мл раствора растворов A и B, встряхивали в течение 1 ч и затем снова промывали в ДМФ 5-10 раз.

Кроме того, получали следующие растворы:

20% пиперидин (в безводном ДМФ)

2M бромуксусную кислоту

50% D1C/A. ДМФ

M раствор каждого амина

Следующие этапы (a), (b) и (c) выполняли 2 раза, добавляли 2,5 мл 20% раствора пиперидина; (b) реакционную колбу встряхивали при 200 об/мин и 25°C, а затем (c) промывали бусины ДМФ от 8 до 10 раз.

Получали 10 мл раствора 2M бромуксусной кислоты.

Также получали 10 мл раствора 50% 3,2 DIC/безводного ДМФ (об/об).

Для каждого амина и каждой библиотеки получали 2M растворы аминов.

Для синтеза пептоида каждый раз при добавлении амина к цепи пептоида использовали 1 мл 2M рабочего раствора.

Этап 3:

1 мл бромуксусной кислоты добавляли в реакционный сосуд;

(b) затем добавляли 1 мл 50% раствора DIC/ДМФ и полученный раствор подвергали (c) действию СВЧ в течение 15 с при 10% мощности.

Этап (c) проводили два раза, вращая колбу из стороны в сторону между этапами СВЧ-обработки.

После каждого этапа СВЧ-обработки выпадал белый осадок. Затем бусины промывали ДМФ 8-10 раз.

Этап 4:

Один мл первого амина в последовательности добавляли в реакционную колбу, содержащую бромированный интермедиат предыдущего этапа и встряхивали сосуд для равномерного распределения амина по бусинам. Затем инициировали реакцию с помощью 2-кратной обработки СВЧ в течение 15 с при 10% мощности. Затем прореагировавшие бусины промывали водным ДМФ 8-10 раз.

Этапы 3 и 4 повторяли до добавления всех аминов, получая целевые пептоиды.

Этап 5:

Затем промывали бусины дихлорметаном (ДХМ) 3 раза и позволяли им высохнуть.

Этап 6:

Затем отщепляли пептоиды от бусин с помощью 95% раствора ТФУК (5 мл). Затем отделяли пептоиды от бусин, промытых растворителем (CH_3CN и вода) для удаления остаточных пептоидов. Для удаления остаточной ТФУК использовали газообразный аргон. Затем пептоиды при необходимости лиофилизировали, исследовали и очищали.

Вышеуказанные условия реакции можно изменить в соответствии с необходимостью, в зависимости от необходимых количеств конкретной композиции бусин.

На фиг. 1-5 в целом продемонстрировано получение библиотеки согласно настоящему изобретению для заболевания, например, диагностики БА, диагностики рака поджелудочной железы и волчанки. В целом, бусины, несущие аминогруппу, присоединяют к аминокислотному остатку путем осуществления ряда этапов, применяя стандартные реагенты в области химии пептидов, взаимодействующие с активированной карбонильной группой, несущей галогенидную группу, которая затем взаимодействовала с мономерным амином, несущим группу R. Этапы цикла 2 и 3 повторяли, как показано на фигурах, получая большие библиотеки пептоидов, содержащие от 1 млн до 2 млн различных лигандов. Библиотека для начального скрининга, полученная на смоле или бусинах Tentagel, обычно содержала аминокислоту метионин в качестве первого мономера в цепи. Автор настоящего изобретения использовал такую аминокислоту для облегчения отщепления от бусин или смолы в отсутствие расщепляемого линкера. Для получения цистеинсодержащих пептоидов с линкерами, не нуждающихся или не требующих использования метионина в качестве первой аминокислоты, использовали смолу Ринка. Цистеинсодержащие пептоиды обычно повторно синтезировали после детектирования предполагаемых активных соединений при начальном скрининге. Сульфогруппа цистеина обеспечивала реакцию пептоидной цепи с, например, другой реакционноспособной группой на носителе диагностической платформы. Повторно синтезированные пептоиды также содержали 1-ил-н-бутиламиногруппу в качестве первой боковой цепи после амина аминокислоты. Считается, что эта группа необходима для экспонирования пептоида и солюбилизации пептоида в водных растворах.

Пример 2. Общая методология скрининга

160-мкм бусины Tentagel с присоединенными выбранными пептоидами оставляли набухать в течение ночи в ДМФ. Затем бусины десять раз промывали водой Millipore в реакционном сосуде при энергичном встряхивании. Каждый раз добавляли свежую воду Millipore, а при 10-й промывке бусины оставляли на ночь при встряхивании (150-200 об/мин). На следующий день бусины аналогичным образом промывали 1X TBST и оставляли при встряхивании (150-200 об/мин) по меньшей мере на 3 ч.

Затем бусины равномерно распределяли по 15-мл коническим пробиркам из расчета приблизительно 0,5 грамма на пробирку в 1X TBST. TBST удаляли, и в каждую пробирку добавляли 4 мл разбавленной нормальной сыворотки человека. Рабочую сыворотку в 1X TBST распределяли нано-раскапыванием, получая желательную концентрацию 20 мкг/мл. Пробирки, содержащие сыворотку и бусины, затем оставляли перемешиваться на ночь при 4°C в темноте. Затем сыворотку удаляли из пробирок пипеткой и заменяли 4 мл 1X TBST. Затем пробирки медленно переворачивали для повторного суспендирования бусин, а затем оставляли осаждаться. TBST дважды удаляли и вновь добавляли, т.е. в общей сложности осуществляли три промывки с использованием TBST.

Затем получали раствор вторичного антитела путем изготовления раствора 5 мкл антитела козы против IgG человека Qdot 655 в 1 мл 1X TBST. После удаления последнего добавленного TBST от бусин добавляли 4 мл раствора Qdot и оставляли бусины перемешиваться на 2 ч при 4°C в темноте. Затем бусинам позволяли осесть и удаляли раствор Qdot. Затем бусины трижды промывали 4 мл 1X TBST. Затем бусины переносили в чистую чашку Петри и рассматривали под УФ-микроскопом с фильтром DAP I. Удаляли все бусины, окрашенные красным.

После завершения первого скрининга бусины вновь переносили в 15-мл конические пробирки и перемешивали при 4°C по меньшей мере в течение 4 ч, до добавления следующего образца сыворотки. Затем к бусинам добавляли сыворотку от больных аналогично добавлению нормальной сыворотки, за исключением того, что сыворотку разбавляли StartingBlock PBS, а не 1X TBST. Однако исходный рабочий раствор разбавляли 1X TBST для получения необходимой концентрации с помощью нанокапельницы. Добавление сыворотки и вторичного антитела осуществляли аналогично тому, как это делали при нормальной сыворотке.

После удаления "активных соединений", характерных для заболевания, их объединяли в 1,5-мл

пробирке Эппендорфа и нагревали при 95°C в течение 25-30 мин в 1% ДСН. Затем ДСН удаляли из пробирки и заменяли водой Millipore. Затем бусины перемешивали в течение 15 мин при 4°C. Затем воду заменяли свежей водой и перемешивали бусины в течение еще 15 мин. Затем воду удаляли, заменяли 50/50 раствором ацетонитрил/вода и оставляли перемешиваться в течение еще 15 мин. Затем бусины распределяли по отдельным лункам в 96-луночного планшета и оставляли сушиться.

Получали раствор 20-30 мг бромистого цианогена, 500 мкл ацетонитрила, 400 мкл ледяной уксусной кислоты и 100 мкл воды Millipore и 20 мкл указанного раствора добавляли в каждую лунку, содержавшую бусины с активными соединениями. Планшет закрывали и оставляли на 16 часов при встряхивании (100 об/мин). Затем снимали крышку и выпаривали раствор для отщепления из лунок. Затем активные соединенияпо каплям переносили на планшет для МС секвенировали с помощью анализатора 4800 MALDI/TOF/FOF.

На фиг. 6 приведена общая схема методологии скрининга, описанная в настоящем документе.

Пример 3. Диагностика реакции на лекарственное средство для лечения заболевания

500 мг 160-мкм бусин Tentagel (библиотеку JC3B) добавляли в 15-мл коническую пробирку. В указанную пробирку добавляли 5 мл ДМФ и оставляли бусины набухать в течение ночи. На следующий день ДМФ удаляли из пробирки пипеткой и заменяли 5 мл 1X TBST. Пробирку переворачивали для перемешивания, а затем позволяли бусинам осесть на дно и удаляли 1X TBST. 5 мл 1X TBST добавляли и удаляли еще пять раз.

Образцы нормальной сыворотки получали путем добавления в пробирку 4 мл ФБР StartingBlock и 7 мкл каждого из четырех отдельных образцов после обработки лекарственным средством. Указанную сыворотку добавляли к промытым бусинам и оставляли бусины и сыворотку перемешиваться в течение ночи при 4°C в темноте. На следующее утро бусины снимали с устройства для перемешивания и позволяли осесть, а затем удаляли сыворотку из пробирки. В пробирку добавляли 4 мл 1X TBST и переворачивали пробирку для перемешивания. Затем TBST удаляли из пробирки пипеткой, заменяли на 4 мл свежего 1X TBST и снова удаляли.

Затем получали раствор бусин DYNA, добавляя 50 мкл перемешанных бусин DYNA с антителами козы против IgG человека в 4 мл 1X TBST. Затем указанную смесь добавляли к промытым бусинам. Затем бусины оставляли перемешиваться на два часа при 4°C в темноте.

Скрининг бусин DYNA выполняли без промывки бусин. Пробирку помещали в магнитный держатель и заполняли до краев 1X TBST. Магнит и пробирку медленно взбалтывали в течение 2 мин и позволяли бусинам осесть в магнитный держатель. TBST и свободные бусины, осевшие на дно, тщательно удаляли, не касаясь бусин с активными соединениями, прикрепленных к боковым стенкам за счет магнита, и заменяли свежим 1X TBST. Указанный процесс повторяли два-три раза, пока не становились видны бусины, присоединенные к боковым стенкам пробирки. Затем бусины с активными соединениями объединяли в одной пробирке.

Оставшиеся бусины, не содержавшие активных соединений, распределяли по 15-мл пробиркам, переворачивали и подвергали быстрому импульсному центрифугированию. Супернатант удаляли и заменяли свежим 1X TBST. Указанный процесс повторяли 6-8 раз, пока видимые бусины DYNA не исчезали из раствора бусин/TBST. Бусины с активными соединениями промывали аналогичным образом.

Бусины вновь объединяли в 15-мл пробирке, добавляли к бусинам нормальную сыворотку аналогично предыдущему описанию и оставляли оседать в течение ночи при 4°C в темноте. Кроме того, 3 мл каждого из четырех нормальных образцов добавляли к 1 мл StartingBlock PBS и полученный раствор добавляли к бусинам DYNA и бусинам с "активными соединениями" в пробирке. На следующий день бусины промывали аналогично промывке для нормальной сыворотки.

20 мкл антитела козы против IgG человека, конъюгированного с квантовой точкой 655, разбавляли в 4 мл 1X TBST (20 мкл Qdot в 1 мл 1X TBST на пробирку с "активными соединениями") и добавляли к бусинам. Раствор перемешивали в течение 2 ч при 4°C в темноте. Пробирки, содержавшие и не содержавшие активных соединений, четырежды промывали 1X TBST и выполняли скрининг ярко-красных бусин под УФ-микроскопом. Остальные бусины перемешивали в 4 мл 1X TBST в течение 1 ч и добавляли образец сыворотки больного или после обработки лекарственным средством аналогично образцу нормальной сыворотки. Магнитный скрининг и добавление Qdot выполняли аналогично описанному выше. Затем активные соединения секвенировали на масс-спектрометре MALDI-TOF/TOF.

Пример 4. Данные микроматрицы по одному измерению

Микроматрицы изготовили, как описано в патентной публикации США № 2010/0303805, включенной в настоящий документ посредством ссылки. Стекла микроматриц накрывали камерой для гибридизации и уравновешивали IXTBST (50 мМ Iris, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 0,1% Твин-20) в течение 15 мин. Затем стекла блокировали 1 мл блокирующего буфера в течение 1 ч при 4°C. Блокирующий буфер удаляли и инкубировали стекла с 1 мл сыворотки (20 мг/мл) в течение 16 ч при 4°C и аккуратном встряхивании. В альтернативном способе стекла блокировали 1 мл лизата E.coli (1,5 мг/мл) в течение 1 ч при 4°C. Лизат E.coli удаляли и инкубировали стекла с 1 мл сыворотки (15 мг/мл) в лизате E.coli (1,5 мг/мл) в течение 18 ч при 4°C и аккуратном встряхивании. Затем микроматрицы трижды промывали 1X TBST и гибридизо-

вали с антителом против IgG, меченным Alexa-647 (5 мг/мл), в течение 2 часов на орбитальном шейкере при 4°C. Камеры кассеты снимали со стекол микроматриц и промывали 1X TBST (3×15 мин), а затем 0,1X TBST (1×10). Затем стекла высушивали на центрифуге (5 мин при 1500 об/мин) и сканировали на сканере для микроматриц (Gene Pix Autoloader 4200), используя 635-нм лазер при 100% мощности и усиление трубки фотоумножителя 600 или 650. Все отсканированные изображения анализировали с помощью программного обеспечения Gene Fix Pro 6.0 и Genespring.

Пример 5. Протокол твердофазного ИФА

96-луночные малеимид-активированные планшеты получили из Thermo Scientific, трижды промывали с использованием 400 мкл/лунку буфера для промывки (0,1М фосфата натрия, 0,15М хлорида натрия, 0,05% Твин-20, pH 7,2), с помощью устройства для промывки планшетов от Beckman Coulter. Исследуемый пептоид разбавляли до 10 мМ в PBS-буфере для связывания (0,1М фосфата натрия, 0,15 М хлорида натрия, 10 мМ ЭДТА, pH 7,2), и 200 мкл раствора пептоида добавляли в соответствующие лунки. Затем планшет оставляли для инкубирования в темноте на 2 ч при комнатной температуре и встряхивании (500 об/мин). Затем раствор пептоида удаляли из лунок с помощью устройства для промывки планшетов и вновь трижды промывали 400 мкл/лунку буфера для промывки. L-цистеин HCl:H_2O (Thermo Scientific) разбавляли буфером для связывания до 10 мкг/мл и добавляли по 200 мкл на лунку. Затем планшет инкубировали в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре и встряхивании при 500 об/мин и трижды промывали. 200 мкл блокирующего буфера StartingBlock™ (PBS) (Thermo Scientific) добавляли в лунки и инкубировали планшет в течение одного часа при 4°C в темноте при встряхивании (500 об/мин). Планшет трижды промывали с помощью устройства для промывки планшетов и получали образцы сыворотки путем серийного разведения в буфере для связывания, начиная от 1:200. Концентрации 1:200 рабочих образцов получали путем нанораскапывания (Thermo Scientific), обеспечивая их сходство. Каждый разбавленный образец встряхивали на вортексе до получения следующего разведения. 200 мкл соответствующего разведения сыворотки (больных и здоровых субъектов), а также буфер для связывания без сыворотки в качестве контроля, добавляли в лунки планшета. Сыворотку оставляли для инкубирования в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте при встряхивании (500 об/мин). Планшет повторно промывали и добавляли в соответствующие лунки 200 мкл 1:30000 разведения антитела козы, меченого ПХ, против IgG человека (Millipore) в буфере для связывания и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании (500 об/мин) в темноте. Планшет трижды промывали, в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина) и оставляли для развития окраски на 30 мин на лабораторном столе в темноте. Для остановки реакции добавляли 100 мкл 2 М стоп-раствора серной кислоты и считывали поглощение в лунках при 450 нм с помощью планшетного считывающего устройства.

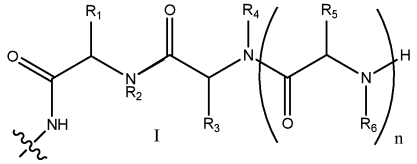
Таким образом, в каждом конкретном случае и в отношении каждого варианта лечения с помощью лекарственного средства можно применять процесс согласно настоящему изобретению для быстрого детектирования биомаркеров, ассоциированных с вызванной лекарственным средством реакцией (например, неблагоприятной реакцией, устойчивостью к лекарству и эффективности терапевтической дозы), и лигандов, связывающихся с такими маркерами. Указанный крупный пул лигандов затем можно использовать в различных диагностических или терапевтических целях. Диагностические платформы включают микроматрицы, средства на основе бусин и системы для твердофазного ИФА. Условия, использованные выше, составляют важный аспект изобретения. Указанные условия включают диапазоны разбавления сыворотки, а также концентрацию конкретного пептоида на бусине или в лунке, и способы детектирования. Количество бусин, содержащих пептоид, может варьироваться в зависимости от конкретного диагностического набора или набора для скрининга. Указанные количества также могут варьироваться в зависимости от применения бусин/лигандов согласно протоколу начального скрининга и способу, приведенному в настоящем документе, и/или их применения в составе диагностического набора, основанного на обнаружении высокоаффинного лиганда.

Специалист в данной области техники должен поймет, что в вышеописанные варианты реализации можно внести изменения без отхода от расширенной сущности изобретения. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается описанными конкретными вариантами реализации; подразумевается, что оно охватывает модификации, входящие в объем изобретения, определенный прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения вызванной лекарственным средством реакции у субъекта, включающий контактирование библиотеки пептоидных лигандов на носителе с биологическим образцом, предварительно полученным у указанного субъекта; определение характеристик связывания одного или более биологических маркеров в указанном образце с одним или более пептоидными лигандами в библиотеке и определение того, связаны ли указанные один или более биологических маркеров с указанной вызванной лекарственным средством реакцией, что обеспечивает определение указанной вызванной лекарственным средством реакции у указанного субъекта, где указанная вызванная лекарственном средством реакция

является нежелательной реакцией на указанное лекарственное средство, побочным эффектом указанного лекарственного средства, устойчивостью к указанному лекарственному средству или эффективностью терапевтической дозы указанного лекарственного средства, где указанная библиотека содержит соединение формулы (I)



I

и где R_1 представляет собой $-(C_1\text{-}C_6)SCH_3$;

R_2 представляет собой H;

R_3-R_6 независимо выбраны из групп, состоящих из H, $-C_1$-C_6-алкила, $-C_1$-C_6-алкил-SCH_3; $-C_0$-C_6-алкил-C_2-C_6-алкенила, $-C_0$-C_6-алкил C_2-C_6-алкинила, $-C_1$-C_6-COOH, $-C_1$-C_6-алкил-OH, $-C_1$-C_6-алкил-NH_2, $-C_3$-C_8-циклоалкила, $-C_1$-C_6-алкиларила, $-C_1$-C_6-алкилгетероарила, $-C_1$-C_6-алкил-$NC(O)C_1$-C_6алкила, $-C_1$-C_6-алкилциклоамида, причем любая из арильных или гетероарильных групп может независимо содержать в качестве заместителей -OH, Cl, F, Br, $-OCH_3$, $-SO_2NH_2$ или $-O-CH_2-O-$; и

n представляет собой 3-11, где указанная библиотека содержит приблизительно от 200000 до 150 миллионов отдельных лигандов, таким образом диагностируя указанную вызванную лекарственным средством реакцию у субъекта.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство представляет собой аторвастатин, клопидогрел, этанерцепт, флутиказон, салметерол, инфликсимаб, валсартан, ритуксимаб, эзомепразол, бевацизумаб, арипипразол, трастузумаб, оланзапин, кветиапин, адалимумаб, монтелукаст, эноксапарин, венлафаксин, пиоглитазон, кандесартан, эсциталопрам, глатирамер или их комбинацию.

3. Способ по п.1, дополнительно включающий этап определения, является ли субъект чувствительным или нечувствительным к лечению или терапии с применением указанного лекарственного средства, на основании определенной вызванной лекарственным средством реакции.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная вызванная лекарственным средством реакция связана с заболеванием или стадией указанного заболевания.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой рак, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, инфекционное заболевание, нейродегенеративное заболевание или сердечно-сосудистое заболевание.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что рак представляет собой рак молочной железы, рак легких, рак предстательной железы, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак яичка, рак яичников, рак кожи, рак головного мозга, рак поджелудочной железы, рак печени, рак желудка, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак пищевода, лимфому или лейкоз, причем лиганды, распознающие маркеры, уникальны для этих болезненных состояний.

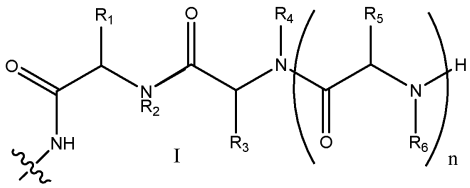
7. Способ по п.5, отличающийся тем, что аутоиммунное заболевание представляет собой волчанку, миастению гравис, рассеянный склероз, нарколепсию, ревматоидный артрит, нефрит, болезнь Шагаса, склеродермию или болезнь Шегрена.

8. Способ по п.5, отличающийся тем, что инфекционное заболевание является следствием вирусной, бактериальной или грибковой инфекции.

9. Способ по п.5, отличающийся тем, что нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, деменцию или болезнь Крейцфельда-Якоба.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная библиотека лигандов содержит множество лигандов, выявленных ранее в начальном скрининге или заранее выбранных на основании известной способности к взаимодействию с указанными лигандсвязывающими маркерами.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что библиотека содержит соединение формулы I



I

причем указанные соединения получают способом, включающим применение реагентов, выбранных из группы, состоящей из:

(A) фурфуриламина; 3,4-диметоксиэтаноламина; бензиламина; N-(2-аминоэтил)ацетамида; N-(3-аминопропил)-2-пирролидинона; этаноламина; глицина; диаминобутана; аллиламина; пипероniламина; метилбензиламина; изобутиламина; 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонамида или циклогексиламина; или

(B) метоксиэтиламина; пипероniламина; циклогексиламина; диаминобутана; метилбензиламина; изобутиламина; фурфуриламина или 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонамида; или

(C) фурфуриламина; этаноламина; глицина; диаминобутана; аллиламина; пипероniламина; метил-

бензиламина; изобутиламина или 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонамида; или

(D) фурфуриламина; N-(2-аминоэтил)ацетамида; N-(3-аминоэтил)-2-пирролидинона; этаноламина; глицина; диаминобутана; аллиламина; пипероniламина; метилбензиламина; изобутиламина; 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонамида; или

(E) цистеина, глицина, аллиламина, этаноламина, изобутиламина, метилбензиламина, пиперонил-амина, метионина, циклогексиламина, 3,4-диметоксифенетиламина, бензиламина, N-(2-аминоэтил)ацетамида, N-(3-аминопропил)-2-пирролидона, 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонамида и фурфуриламина и при этом

R_1 выбран из группы, состоящей из $-(C_1-C_6)SCH_3$;

R_2 выбран из H;

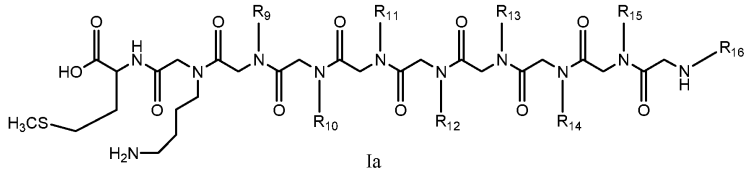
R_3 и R_5 независимо выбраны из групп, состоящих из H, $-C_1-C_6$-алкила, $-C_1-C_6$-алкил-SCH_3; $-C_0-C_6$-алкил-C_2-C_6-алкенила, $-C_0-C_6$-алкил-C_2-C_6-алкинила, $-C_1-C_6$-COOH, $-C_1-C_6$-алкил-OH, $-C_1-C_6$-алкил-$N(R)_2$, $-C_3-C_8$-циклоалкила, $-C_1-C_6$-алкиларила, $-C_1-C_6$-алкилгетероарила, $-C_1-C_6$-алкил-$NC(O)C_1-C_6$-алкила, $-C_1-C_6$-алкилциклоамида, причем любая из арильных или гетероарильных групп может независимо содержать в качестве заместителей -OH, Cl, F, Br, $-OCH_3$, $-SO_2NH_2$ или $-O-CH_2-O-$;

R_4 выбрана из группы, состоящей из фурфурила или $-(C_1-C_6$-алкил$)-NR_7R_8$,

R_6 выбрана из группы, состоящей из H, 1-ил-аллила, 1-ил-2-гидроксиэтила, изобутила, 1-ил-n-бутиламина, метилбензила, пиперонила, циклогексила, 1-ил-2-(3,4-диметоксифенил)этила, бензила, 1-ил-2-(ацетамид)этила, 1-ил-3-2-пирролидинона, 1-ил-2-(4-бензолсульфонамид))этила и фурфурила, и

n составляет от 3 до 11.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что библиотека содержит соединение формулы Ia



Ia

причем указанное соединение выбрано из группы, состоящей из соединения формулы Ia, причем:

(a) R_9 представляет собой n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пипероniл; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой пипероniл; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(b) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой 1-ил-2,2-диметилэтил (изобутил); R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(c) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пипероniл; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(d) R_9 представляет собой пипероniл; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(e) R_9 представляет собой 1-ил-н-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой пипероniл;

(f) R_9 представляет собой пипероniл; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изопропил; R_{12} представляет собой изопропил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил;

(g) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пипероniл; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой пипероniл; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(h) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой пипероniл;

(i) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(j) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(k) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой изобутил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{12} представляет собой пиперонил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(l) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой изобутил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(m) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой фурфурил и R_{16} представляет собой фурфурил;

(n) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой фурфурил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой фурфурил;

(o) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой пиперонил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(p) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой изобутил;

(q) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(r) R_9 представляет собой метилбензил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой пиперонил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(s) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой пиперонил;

(t) R_9 представляет собой метилбензил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой изобутил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(u) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой изобутил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(v) R_9 представляет собой изобутил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой пиперонил и R_{16} представляет собой пиперонил;

(w) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой изобутил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{14} представляет собой изобутил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(x) R_9 представляет собой фурфурил; R_{10} представляет собой фурфурил; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(y) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой пиперонил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(z) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(aa) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил;

(bb) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой изобутил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой пиперонил;

(cc) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой циклогексил; R_{12} представляет собой пиперонил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(dd) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{14} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(ee) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой изобутил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(ff) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(gg) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой метилбензил;

(hh) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-н-бутиламин;

(ii) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой фурфурил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой фурфурил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(jj) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой изобутил;

(kk) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(ll) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(mm) R_9 представляет собой 1-ил-н-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(nn) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(oo) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой пиперонил; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(pp) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метиламин; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой пиперонил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

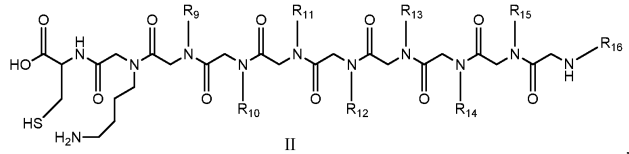
(qq) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой фурфурил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой изобутил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(rr) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой изобутил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил;

(ss) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой циклогексил и R_{16} представляет собой пиперонил;

и их фармацевтически приемлемые соли.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что библиотека содержит соединение формулы



II

,

причем указанное соединение выбрано из группы, состоящей из соединения формулы II, причем:

(a) R_9 представляет собой n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(b) R_9 представляет собой 1-ил-н-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой 1-ил-2,2-диметилэтил (изобутил); R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(c) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(d) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(e) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой пиперонил;

(f) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-н-бутиламин; R_{11} представляет собой изопропил; R_{12} представляет собой изопропил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил;

(g) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(h) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет со-

бой пиперонил;

(i) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(j) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(k) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой изобутил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид)этил; R_{12} представляет собой пиперонил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(l) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой изобутил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(m) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-н-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой фурфурил и R_{16} представляет собой фурфурил;

(n) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой фурфурил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой фурфурил;

(o) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой пиперонил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(p) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой изобутил;

(q) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(r) R_9 представляет собой метилбензил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой пиперонил и R_{16} представляет собой 1-ил-н-бутиламин;

(s) R_9 представляет собой 1-ил-н-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-н-бутиламин; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-н-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой пиперонил;

(t) R_9 представляет собой метилбензил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой изобутил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(u) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой изобутил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(v) R_9 представляет собой изобутил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой пиперонил и R_{16} представляет собой пиперонил;

(w) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой изобутил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{14} представляет собой изобутил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(x) R_9 представляет собой фурфурил; R_{10} представляет собой фурфурил; R_{11} представляет собой пи-

перонил; R_{12} представляет собой циклогексил; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(y) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой пиперонил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(z) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(aa) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил;

(bb) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой изобутил; R_{13} представляет собой циклогексил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой пиперонил;

(cc) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой циклогексил; R_{12} представляет собой пиперонил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(dd) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{14} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{15} представляет собой изобутил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(ee) R_9 представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой изобутил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(ff) R_9 представляет собой 1-ил-н-бутиламин; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(gg) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой метилбензил;

(hh) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(ii) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой фурфурил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой фурфурил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(jj) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил и R_{16} представляет собой изобутил;

(kk) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(ll) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой 1-ил-n-бутиламин;

(mm) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{11} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{12} представля-

ет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(nn) R_9 представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой пиперонил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой циклогексил;

(oo) R_9 представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил; R_{10} представляет собой метилбензил; R_{11} представляет собой метилбензил; R_{12} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{13} представляет собой метилбензил; R_{14} представляет собой пиперонил; R_{15} представляет собой 1-ил-n-бутиламин и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(pp) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метиламин; R_{13} представляет собой пиперонил; R_{14} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{15} представляет собой пиперонил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил;

(qq) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой фурфурил; R_{12} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{13} представляет собой изобутил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой метилбензил и R_{16} представляет собой метилбензил;

(rr) R_9 представляет собой пиперонил; R_{10} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{11} представляет собой изобутил; R_{12} представляет собой изобутил; R_{13} представляет собой 1-ил-2-метоксиэтил; R_{14} представляет собой циклогексил; R_{15} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил и R_{16} представляет собой 1-ил-2-(4-(бензолсульфонамид))этил;

(ss) R_9 представляет собой циклогексил; R_{10} представляет собой циклогексил; R_{11} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{12} представляет собой метилбензил; R_{13} представляет собой 1-ил-n-бутиламин; R_{14} представляет собой метилбензил; R_{15} представляет собой циклогексил и R_{16} представляет собой пиперонил;

и их фармацевтически приемлемые соли.

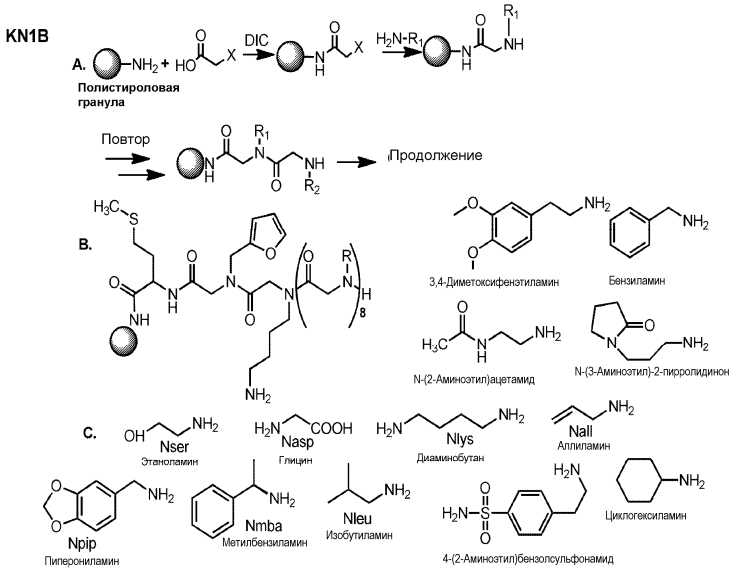
14. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная библиотека лигандов представляет собой библиотеку лигандов на основе бусин, включающую множество бусин, содержащих лиганды, связанные с указанными бусинами.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный носитель представляет собой матрицу.

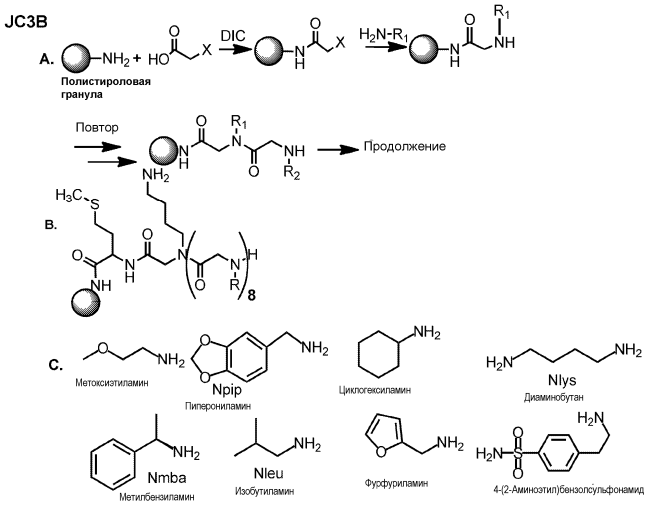
16. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанная матрица представляет собой микроматрицу, предметное стекло, планшет или чип.

17. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанная матрица включает твердый носитель, имеющий поверхность; множество лигандов, связанных с указанным носителем, причем каждый из указанных лигандов включает якорный сегмент, стабильно связанный с поверхностью носителя, пептоидный сегмент и линкерный сегмент, связывающий якорный и пептоидный сегменты и находящийся между ними.

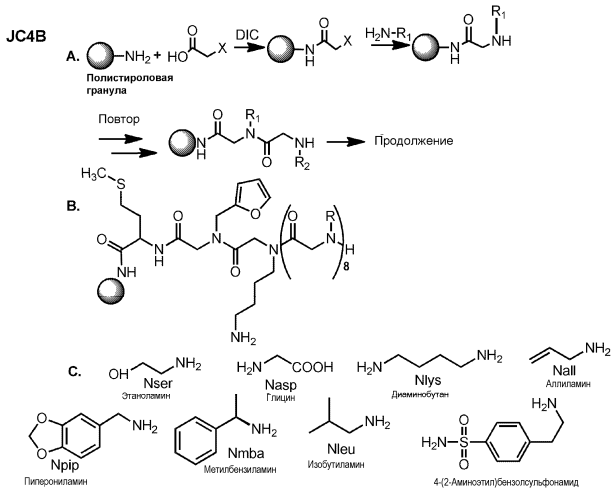
18. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанная матрица включает от приблизительно 1000 до 100000 различных лигандов.



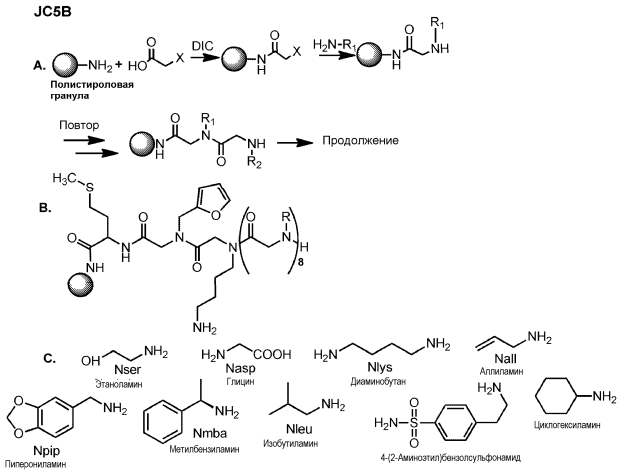
Фиг. 1



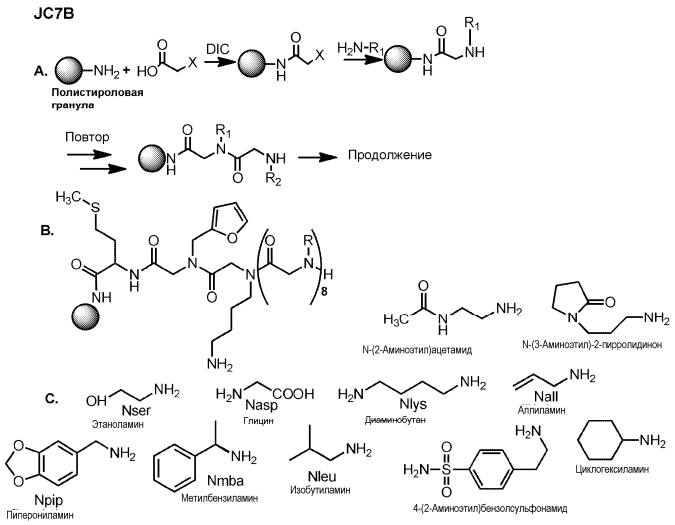
Фиг. 2



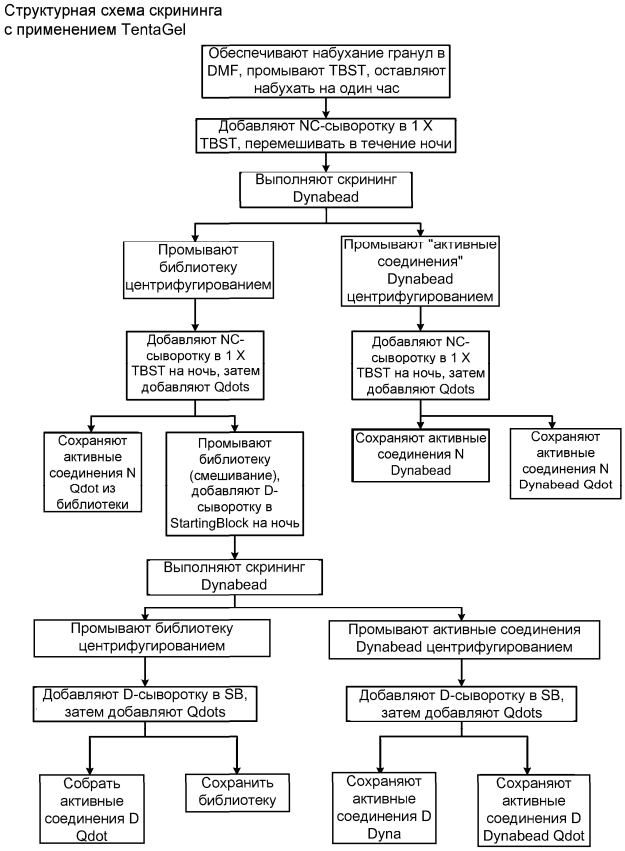
Фиг. 3



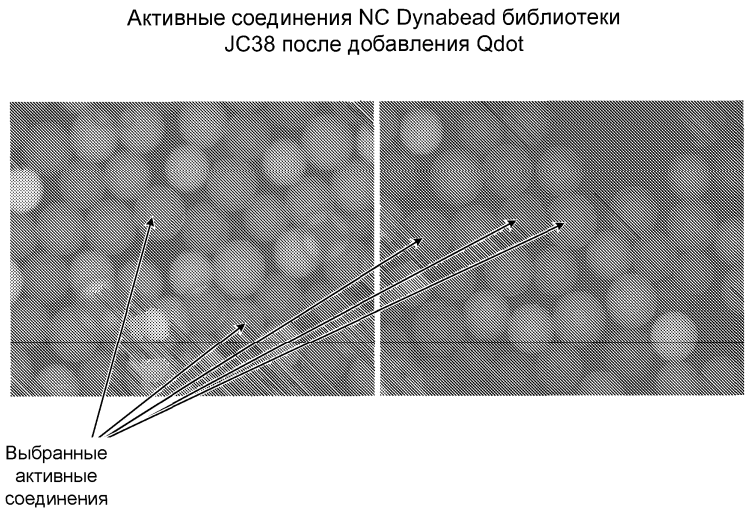
Фиг. 4


JC7B
A.
Полистироловая гранула
DIC
Повтор
Продолжение
B.
C.
Nser
Этаноламин
Nasp
Глицин
Nlys
Диаминобутан
Nall
Аллиламин
N-(2-Аминоэтил)ацетамид
N-(3-Аминоэтил)-2-пирролидинон
Npip
Пиперонилламин
Nmba
Метилбензиламин
Nleu
Изобутиламин
4-(2-Аминоэтил)бензолсульфонамид
Циклогексиламин

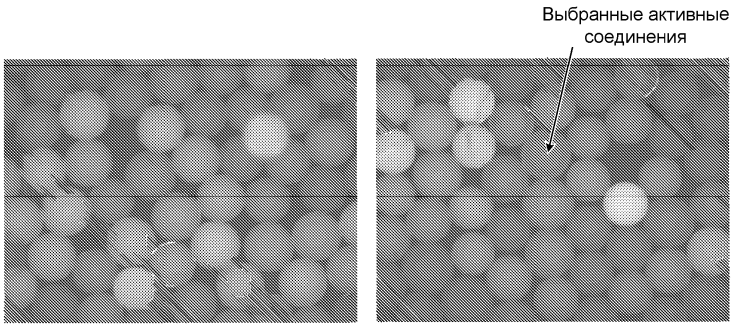
Фиг. 5


Структурная схема скрининга
с применением TentaGel
Обеспечивают набухание гранул в DMF, промывают TBST, оставляют набухать на один час
Добавляют NC-сыворотку в 1 X TBST, перемешивать в течение ночи
Выполняют скрининг Dynabead
Промывают библиотеку центрифугированием
Промывают "активные соединения" Dynabead центрифугированием
Добавляют NC-сыворотку в 1 X TBST на ночь, затем добавляют Qdots
Добавляют NC-сыворотку в 1 X TBST на ночь, затем добавляют Qdots
Сохраняют активные соединения N Qdot из библиотеки
Промывают библиотеку (смешивание), добавляют D-сыворотку в StartingBlock на ночь
Сохраняют активные соединения N Dynabead
Сохраняют активные соединения N Dynabead Qdot
Выполняют скрининг Dynabead
Промывают библиотеку центрифугированием
Промывают активные соединения Dynabead центрифугированием
Добавляют D-сыворотку в SB, затем добавляют Qdots
Добавляют D-сыворотку в SB, затем добавляют Qdots
Собрать активные соединения D Qdot
Сохранить библиотеку
Сохраняют активные соединения D Dyna
Сохраняют активные соединения D Dynabead Qdot

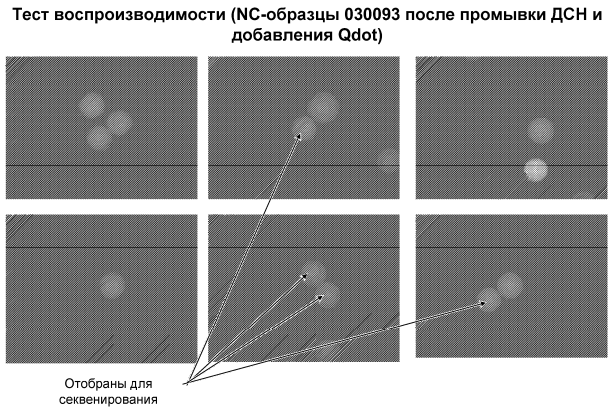
Фиг. 6



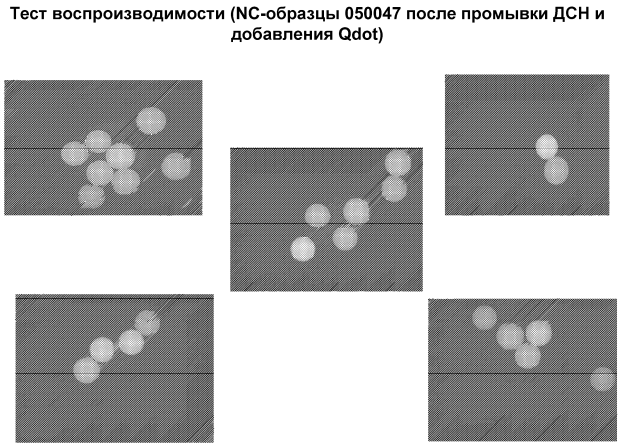
Фиг. 7



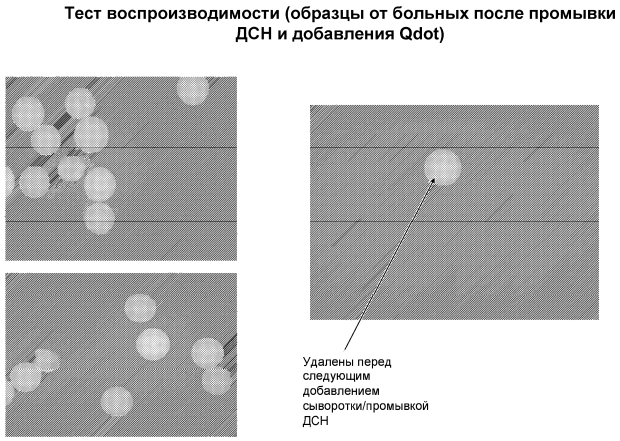
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

Последовательности выбранных активных соединений

Циклогексиламин	Бензолсульфонамид	Метилбензиламин	Пипериниламин	Метилбензиламин	Пипериниламин	Диаминобутан	Диаминобутан
Пипериниламин	Метилбензиламин	Циклогексиламин	Циклогексиламин	Метоксиэтиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Диаминобутан
Циклогексиламин	Бензолсульфонамид	Циклогексиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан
Диаминобутан	Изобутиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Циклогексиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Бензолсульфонамид
Метоксиэтиламин	Метилбензиламин	Циклогексиламин	Диаминобутан	Пипериниламин	Бензолсульфонамид	Изобутиламин	Метоксиэтиламин
Метилбензиламин	Бензолсульфонамид	Изобутиламин	Метоксиэтиламин	Циклогексиламин	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Диаминобутан
Фурфуриламин	Фурфуриламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метоксиэтиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Метоксиэтиламин
Фурфуриламин	Бензолсульфонамид	Метоксиэтиламин	Метоксиэтиламин	Фурфуриламин	Диаминобутан	Циклогексиламин	Циклогексиламин
Метилбензиламин	Метоксиэтиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метоксиэтиламин	Бензолсульфонамид	Пипериниламин	Диаминобутан
Изобутиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Диаминобутан	Диаминобутан	Пипериниламин	Циклогексиламин	Циклогексиламин
Метилбензиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Пипериниламин	Бензолсульфонамид	Метоксиэтиламин	Диаминобутан	Пипериниламин
Диаминобутан	Пипериниламин	Диаминобутан	Пипериниламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин
Пипериниламин	Метоксиэтиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Диаминобутан	Диаминобутан
Метоксиэтиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Изобутиламин	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Метилбензиламин
Циклогексиламин	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Циклогексиламин	Изобутиламин	Изобутиламин	Диаминобутан	Метоксиэтиламин
Пипериниламин	Пипериниламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Метилбензиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Изобутиламин
Циклогексиламин	Метоксиэтиламин	Изобутиламин	Бензолсульфонамид	Метоксиэтиламин	Метилбензиламин	Изобутиламин	Бензолсульфонамид
Циклогексиламин	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Пипериниламин	Циклогексиламин	Пипериниламин	Фурфуриламин	Фурфуриламин
Метоксиэтиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Диаминобутан	Метоксиэтиламин	Метоксиэтиламин	Пипериниламин	Пипериниламин

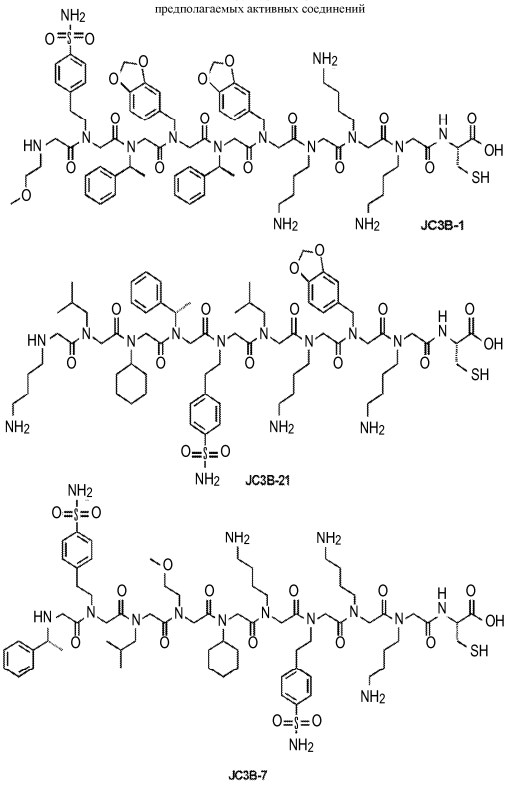
Фиг. 12А

Последовательности выбранных активных соединений

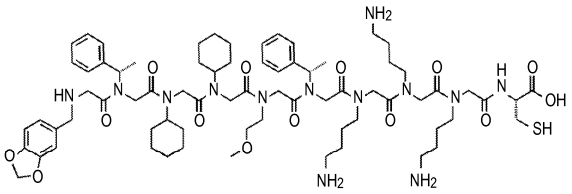
Диаминобутан	Изобутиламин	Циклогексиламин	Метилбензиламин	Бензолсульфонамид	Изобутиламин	Диаминобутан	Пипероniламин
Бензолсульфонамид	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Бензолсульфонамид	Бензолсульфонамид
Пипероniламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Циклогексиламин	Изобутиламин	Диаминобутан	Метоксиэтиламин	Диаминобутан
Метоксиэтиламин	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Пипероniламин	Циклогексиламин	Метилбензиламин	Циклогексиламин
Циклогексиламин	Изобутиламин	Метоксиэтиламин	Бензолсульфонамид	Метоксиэтиламин	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Метоксиэтиламин
Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Изобутиламин	Пипероniламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метоксиэтиламин
Циклогексиламин	Бензолсульфонамид	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Метилбензиламин	Бензолсульфонамид	Метилбензиламин	Диаминобутан
Метилбензиламин	Диаминобутан	Метоксиэтиламин	Метоксиэтиламин	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Метоксиэтиламин	Диаминобутан
Диаминобутан	Метилбензиламин	Циклогексиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Циклогексиламин	Циклогексиламин
Циклогексиламин	Метилбензиламин	Циклогексиламин	Фурфуриламин	Бензолсульфонамид	Метилбензиламин	Фурфуриламин	Диаминобутан
Изобутиламин	Метоксиэтиламин	Метилбензиламин	Метоксиэтиламин	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Метилбензиламин	Диаминобутан
Метилбензиламин	Бензолсульфонамид	Циклогексиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Бензолсульфонамид
Диаминобутан	Метилбензиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Бензолсульфонамид
Метилбензиламин	Бензолсульфонамид	Циклогексиламин	Диаминобутан	Метоксиэтиламин	Бензолсульфонамид	Бензолсульфонамид	Диаминобутан
Циклогексиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Пипероniламин	Диаминобутан	Диаминобутан
Метоксиэтиламин	Диаминобутан	Пипероniламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Бензолсульфонамид
Диаминобутан	Пипероniламин	Диаминобутан	Пипероniламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Пипероniламин
Метилбензиламин	Метилбензиламин	Циклогексиламин	Изобутиламин	Метоксиэтиламин	Фурфуриламин	Циклогексиламин	Циклогексиламин
Бензолсульфонамид	Бензолсульфонамид	Циклогексиламин	Метоксиэтиламин	Изобутиламин	Изобутиламин	Диаминобутан	Пипероniламин
Пипероniламин	Циклогексиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Диаминобутан	Циклогексиламин	Циклогексиламин

Фиг. 12B

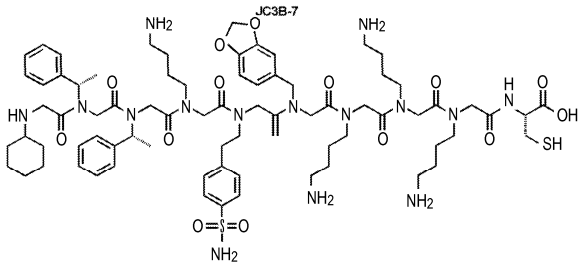
Химические структуры выбранных предполагаемых активных соединений



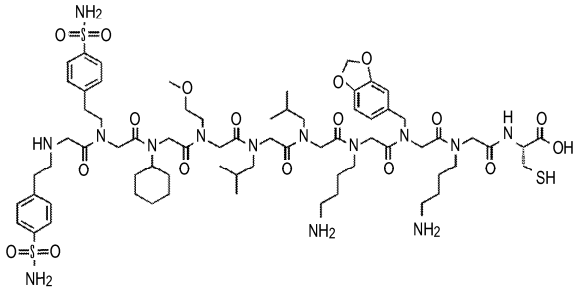
Фиг. 13A



JC3B-3



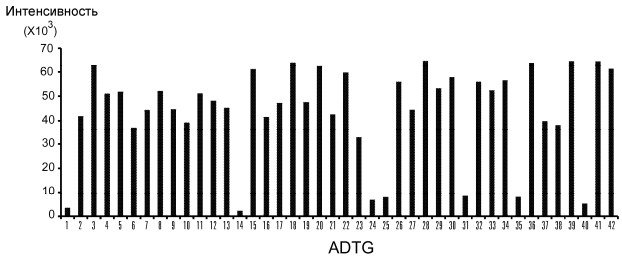
JC3B-7



JC3B-R8

JC3B-R12

Фиг. 13B



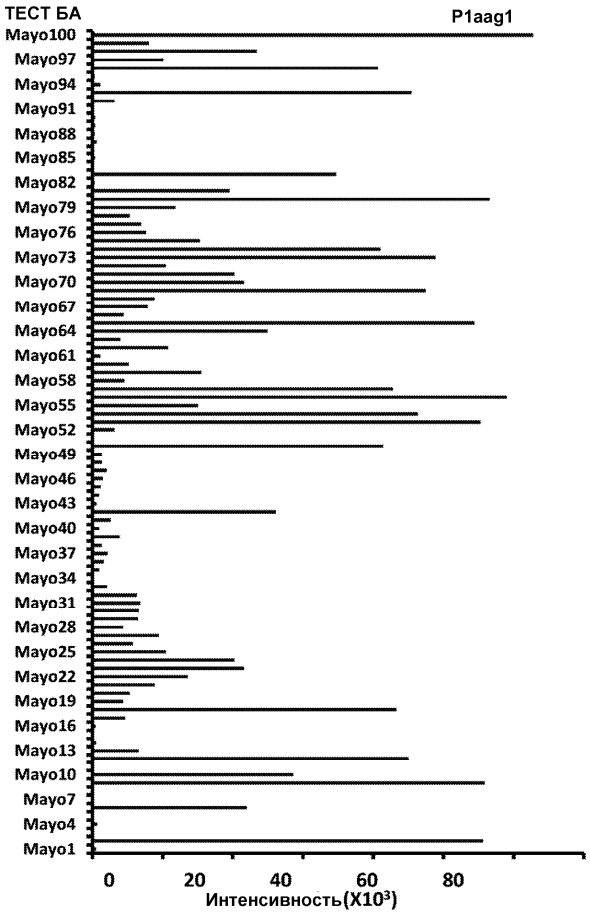
Фиг. 14

Циклогекс	Бензолсульфонамид	Метилбензиламин	Пиперониламин	Метилбензиламин	Пиперониламин	Диамино	Диамино
Циклогекс	Бензолсульфонамид	Циклогексиламин	Диамино	Диамино	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Диамино
Циклогексиламин	Бензолсульфонамид	Диамино	Циклогексиламин	Изобутиламин	Изобутиламин	Диамино	Метоксиэтиламин
Циклогексиламин	Метоксиэтиламин	Изобутиламин	Бензолсульфонамид	Метоксиэтиламин	Метилбензиламин	Изобутиламин	Бензолсульфонамид
Циклогексиламин	Бензолсульфонамид	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Метилбензиламин	Бензолсульфонамид	Метилбензиламин	Диаминобутан
Циклогексиламин	Метилбензиламин	Циклогексиламин	Фурфуриламин	Бензолсульфонамид	Метилбензиламин	Фурфуриламин	Диаминобутан
Циклогексиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Пиперониламин	Диаминобутан	Диаминобутан
Пиперониламин	Метилбензиламин	Циклогексиламин	Циклогексиламин	Метоксиэтиламин	Метилбенз	Диамино	Диамино
Пиперониламин	Метоксиэтиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Диамино	Метилбензиламин	Диамино	Диамино
Пиперониламин	Пиперониламин	Диамино	Диамино	Метилбензиламин	Диамино	Диамино	Изобутиламин
Диаминобутан	Метилбензиламин	Циклогексиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Циклогексиламин	Циклогексиламин
Пиперониламин	Этаноламин	Бензолсульфонамид	Глицин	Глицин	Метилбензиламин	Этаноламин	Изобутиламин
Пиперониламин	Этаноламин	Бензолсульфонамид	Глицин	Глицин	Метилбензиламин	Этаноламин	Изобутиламин
Бензолсульфонамид	Пиперониламин	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Диаминобутан	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Метилбензиламин
Диаминобутан	Метилбензиламин	Пиперониламин	Диаминобутан	Циклогексиламин	Метилбензиламин	Бензолсульфонамид	Циклогексиламин
Пиперониламин	Изобутиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Изобутиламин	Диаминобутан	Циклогексиламин
Метилбензиламин	Изобутиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Пиперониламин	Диаминобутан	Диаминобутан
Диамино	Изобутиламин	Метилбензиламин	Диамино	Циклогексиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Бензолсульфонамид
Изобутиламин	Диамино	Диамино	Диамино	Диамино	Пиперониламин	Циклогексиламин	Циклогексиламин
Диамино	Пиперониламин	Диамино	Пиперониламин	Диамино	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин

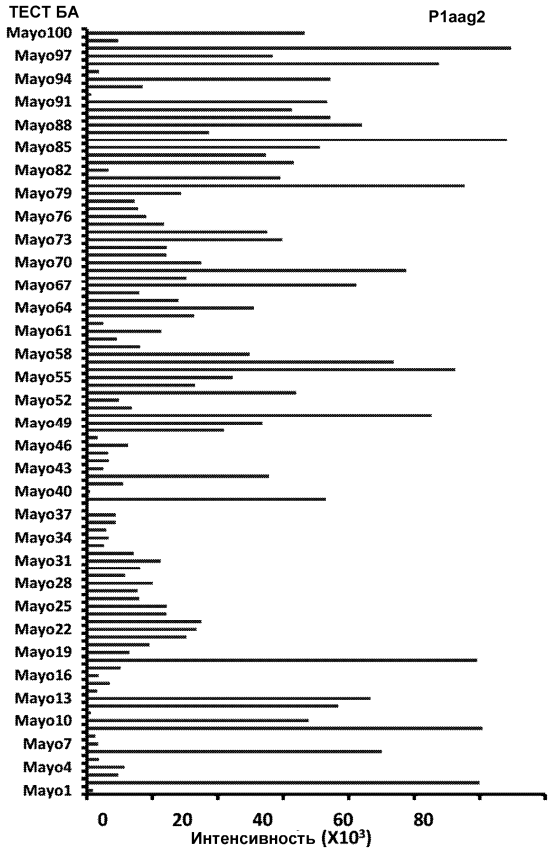
Фиг. 15A

Метоксиэтиламин	Диамино	Диамино	Диамино	Метоксиэтиламин	Метоксиэтиламин	Пипероniламин	Пипероniламин
Диаминобутан	Пипероniламин	Изобутиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Метилбензиламин	Диаминобутан	Глицин
Бензолсульфонамид	Бензолсульфонамид	Диамино	Диамино	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Бензолсульфонамид	Бензолсульфонамид
Диаминобутан	Метилбензиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Бензолсульфонамид
Бензолсульфонамид	Бензолсульфонамид	Циклогексиламин	Метоксиэтиламин	Изобутиламин	Изобутиламин	Диаминобутан	Пипероniламин
Этаноламин	Пипероniламин	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Метилбензиламин	Изобутиламин	Бензолсульфонамид	Изобутиламин
Диаминобутан	Изобутиламин	Диаминобутан	Этаноламин	Этаноламин	Глицин	Диаминобутан	Диаминобутан
Диаминобутан	Метилбензиламин	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Циклогексиламин	Метоксиэтиламин	Изобутиламин	Метоксиэтиламин
Изобутиламин	Этаноламин	Диаминобутан	Изобутиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Диаминобутан
Метилбензиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Диаминобутан	Метоксиэтиламин	Изобутиламин	Циклогексиламин	Циклогексиламин
Циклогексиламин	Изобутиламин	Аллиламин	Глицин	Глицин	Этаноламин	Глицин	Пипероniламин
Аллиламин	Метилбензиламин	Этаноламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Диамино	Диамино
Аллиламин	Этаноламин	Пипероniламин	Аллиламин	Аллиламин	Аллиламин	Диаминобутан	Диаминобутан
Аллиламин	Изобутиламин	Глицин	Глицин	Метилбензиламин	Аллиламин	Бензолсульфонамид	Бензолсульфонамид
Аллиламин	Бензолсульфонамид	Изобутиламин	Пипероniламин	Диаминобутан	Аллиламин	Бензолсульфонамид	Изобутиламин
Аллиламин	Бензолсульфонамид	Изобутиламин	Пипероniламин	Диаминобутан	Аллиламин	Бензолсульфонамид	Изобутиламин
Аллиламин	Этаноламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Этаноламин	Пипероniламин	Изобутиламин	
Аллиламин	Этаноламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Метилбензиламин	Аллиламин	Пипероniламин	Диаминобутан
Пипероniламин	Пипероniламин	Изобутиламин	Глицин	Изобутиламин	Диаминобутан	Пипероniламин	Изобутиламин
Диаминобутан	Циклогексиламин	Глицин	Циклогексиламин	Циклогексиламин	Циклогексиламин	Пипероniламин	Бензолсульфонамид
Пипероniламин	Глицин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Изобутиламин	Диаминобутан	Циклогексиламин

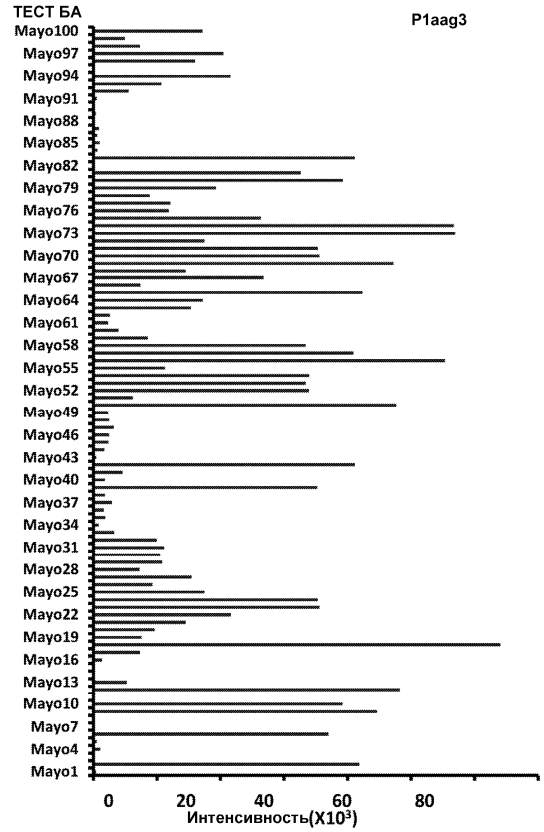
Фиг. 15B



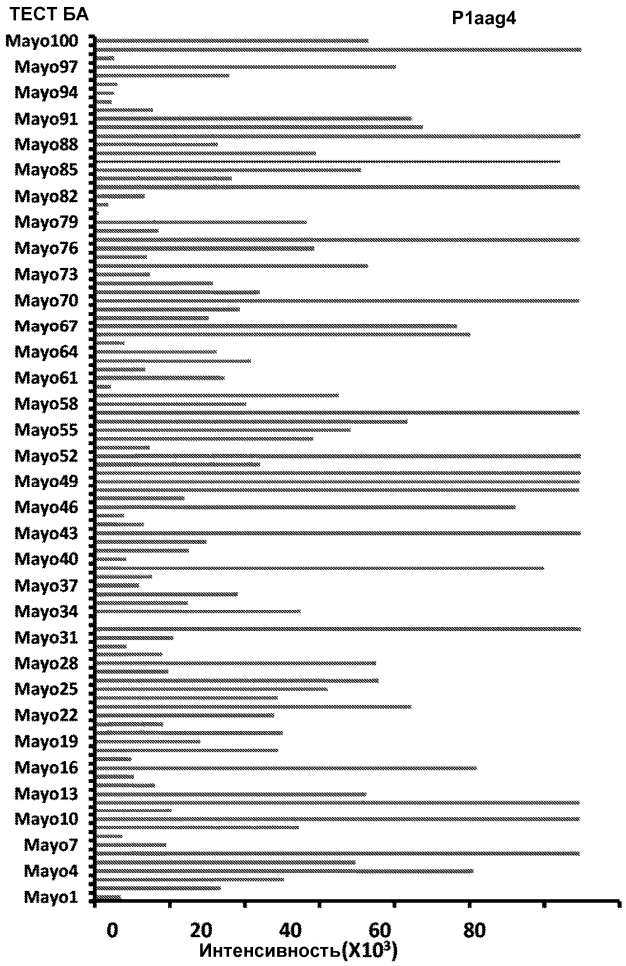
Фиг. 16A



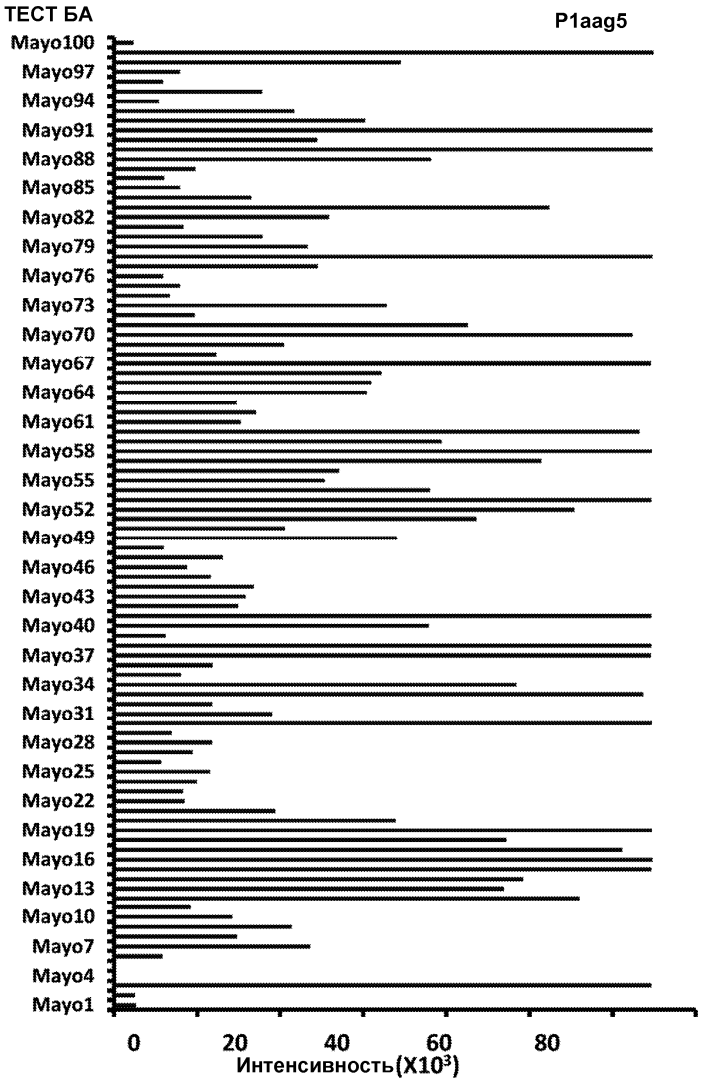
Фиг. 16B



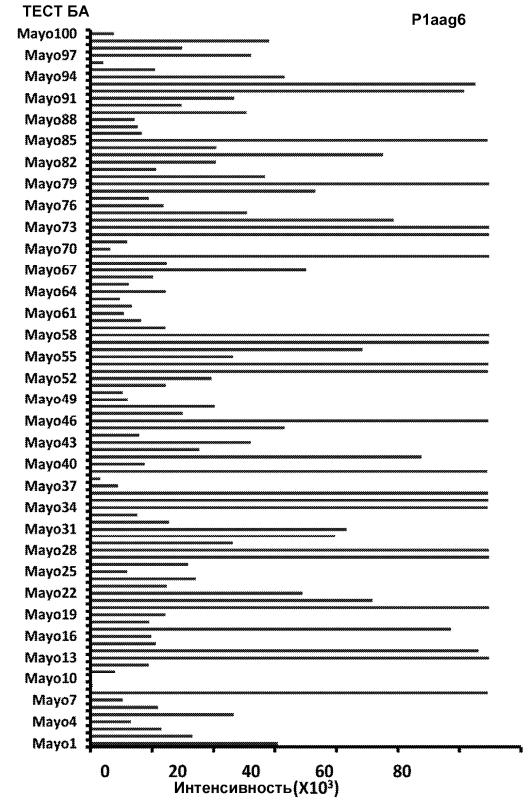
Фиг. 17A


ТЕСТ БА
P1aag4
Mayo100
Mayo97
Mayo94
Mayo91
Mayo88
Mayo85
Mayo82
Mayo79
Mayo76
Mayo73
Mayo70
Mayo67
Mayo64
Mayo61
Mayo58
Mayo55
Mayo52
Mayo49
Mayo46
Mayo43
Mayo40
Mayo37
Mayo34
Mayo31
Mayo28
Mayo25
Mayo22
Mayo19
Mayo16
Mayo13
Mayo10
Mayo7
Mayo4
Mayo1
0
20
40
60
80
Интенсивность(X10³)

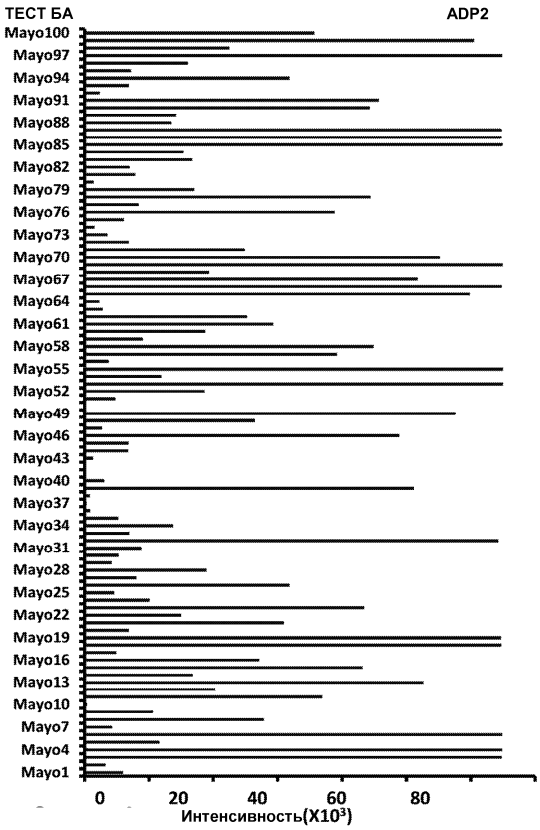
Фиг. 17B


ТЕСТ БА
P1aag5
Mayo100
Mayo97
Mayo94
Mayo91
Mayo88
Mayo85
Mayo82
Mayo79
Mayo76
Mayo73
Mayo70
Mayo67
Mayo64
Mayo61
Mayo58
Mayo55
Mayo52
Mayo49
Mayo46
Mayo43
Mayo40
Mayo37
Mayo34
Mayo31
Mayo28
Mayo25
Mayo22
Mayo19
Mayo16
Mayo13
Mayo10
Mayo7
Mayo4
Mayo1
0
20
40
60
80
Интенсивность(X10³)

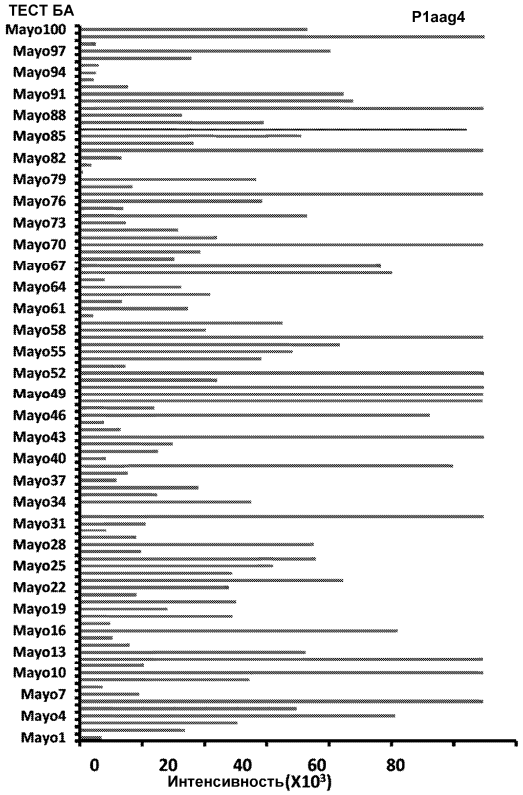
Фиг. 18A



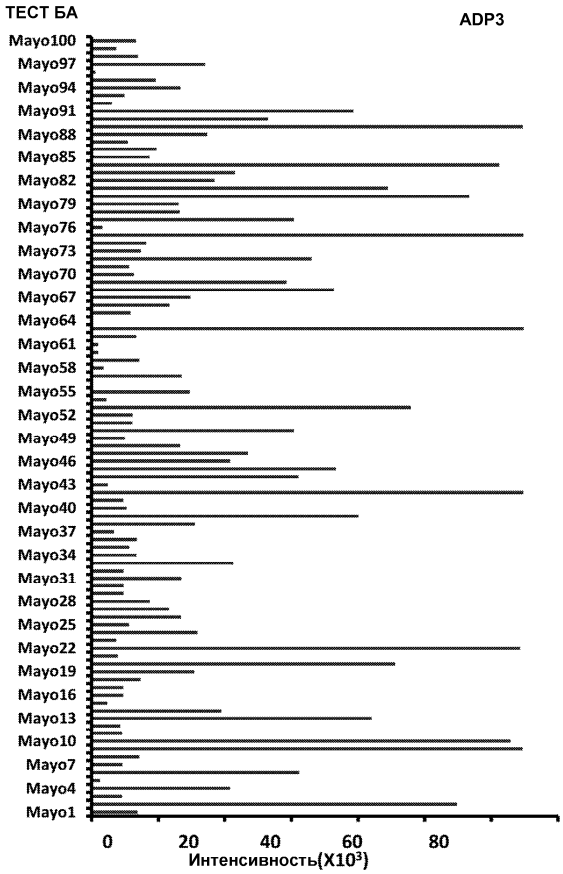
Фиг. 18B



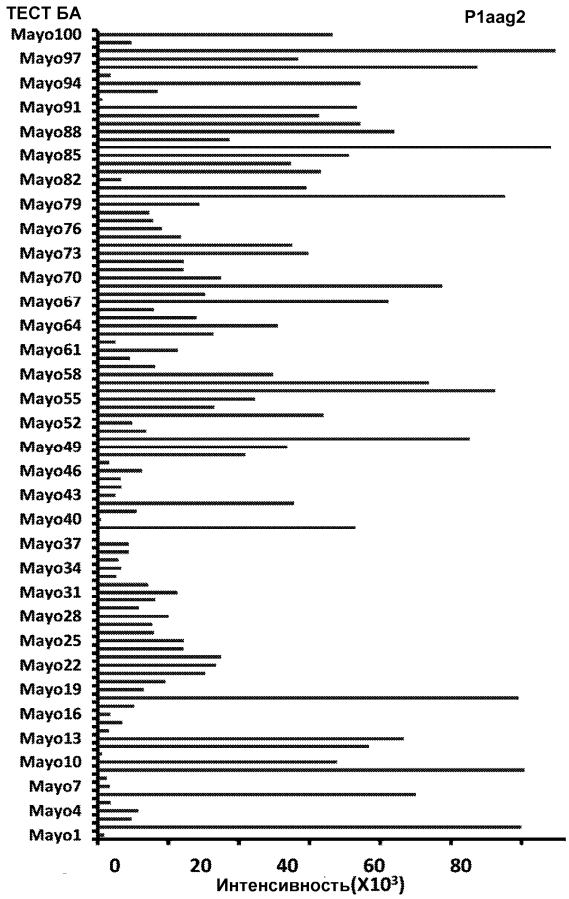
Фиг. 19A



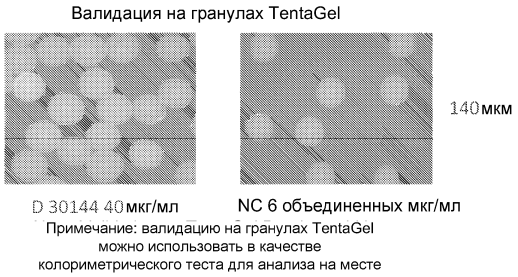
Фиг. 19B



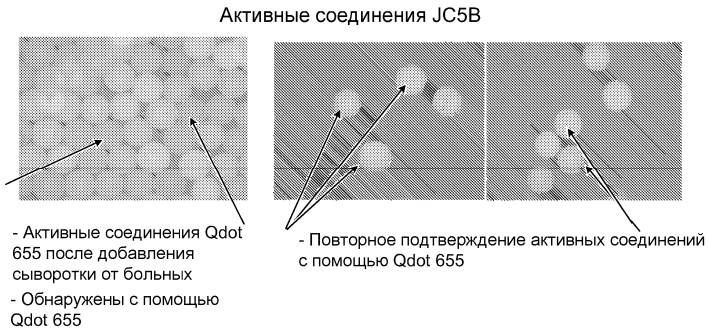
Фиг. 20A



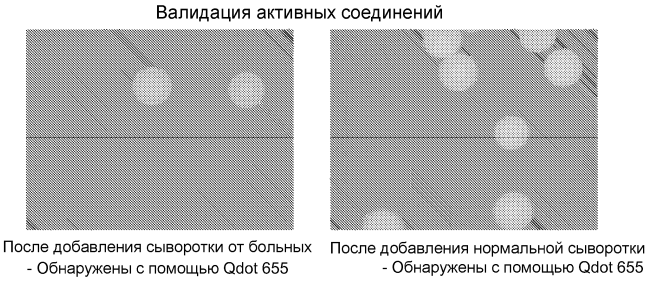
Фиг. 20B



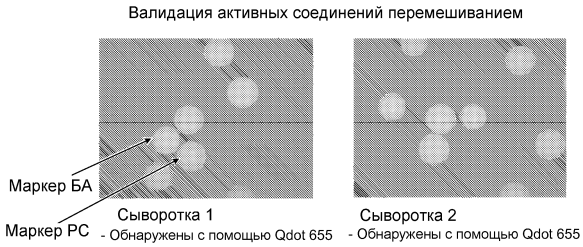
Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24

Последовательности активных соединений PC-JC3B

Диаминобутан	Метилбензиламин	Изобутиламин	Циклогексиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Пиперониламин	Диаминобутан	JC3B-28(B7)
Диаминобутан	Метилбензиламин	Диаминобутан	Изобутиламин	Бензолсульфонамид	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Метилбензиламин	JC3B-29(B8)
Метоксиэтиламин	Диаминобутан	Метоксиэтиламин	Изобутиламин	Метоксиэтиламин	Метоксиэтиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	JC3B-30(b9)
Изобутиламин	Циклогексиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Метилбензиламин	Бензолсульфонамид	Бензолсульфонамид	Метилбензиламин	JC3B-31 (B12)
Метилбензиламин	Циклогексиламин	Диаминобутан	Метоксиэтиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	JC3B-32(B13)
Диаминобутан	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Метоксиэтиламин	Метилбензиламин	Циклогексиламин	Циклогексиламин	JC3B-33(b14)
Метилбензиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Изобутиламин	Фурфуриламин	Фурфуриламин	JC3B-34(b15)
Метилбензиламин	Диаминобутан	Метоксиэтиламин	Диаминобутан	Циклогексиламин	Циклогексиламин	Бензолсульфонамид	Метилбензиламин	JC3B-35(B16)
Диаминобутан	Изобутиламин	Изобутиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Изобутиламин	JC3B-36(b17)
Диаминобутан	Метилбензиламин	Циклогексиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Изобутиламин	JC3B-37(b18)
Изобутиламин	Диаминобутан	Изобутиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Циклогексиламин	Циклогексиламин	JC3B-38(B11)
Метоксиэтиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Изобутиламин	Циклогексиламин	Циклогексиламин	JC3B-39(B10)

Линкеры: диаминобутан, метионин

Фиг. 25

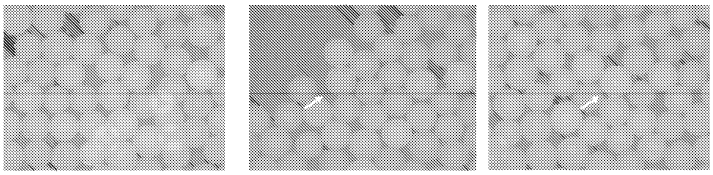
Последовательности активных соединений PC-JC5B

Диаминобутан	Изобутиламин	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Диаминобутан	Циклогексиламин	Пиперониламин	JC5B-17(E1)
Диаминобутан	Циклогексиламин	Изобутиламин	Аллиламин	Диаминобутан	Циклогексиламин	Пиперониламин	Пиперониламин	JC5B-18(E2)
Диаминобутан	Диаминобутан	Метилбензиламин	Пиперониламин	Пиперониламин	Циклогексиламин	Пиперониламин	Метилбензиламин	JC5B-19(E3)
Пиперониламин	Аллиламин	Диаминобутан	Аллиламин	Бензолсульфонамид	Изобутиламин	Циклогексиламин	Изобутиламин	JC5B-20(E4)
Пиперониламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Циклогексиламин	Пиперониламин	Изобутиламин	Пиперониламин	JC5B-21(E5)
Этаноламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Метилбензиламин	Пиперониламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Диаминобутан	JC5B-22(E6)
Диаминобутан	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Пиперониламин	Диаминобутан	Циклогексиламин	Метилбензиламин	Этаноламин	JC5B-23(E7)
Пиперониламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Метилбензиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Пиперониламин	Метилбензиламин	JC5B-24(E8)
Метилбензиламин	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Пиперониламин	Пиперониламин	Аллиламин	Метилбензиламин	JC5B-25(E9)
Диаминобутан	Метилбензиламин	Диаминобутан	Пиперониламин	Метилбензиламин	Пиперониламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	JC5B-26(E10)
Изобутиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Пиперониламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Бензолсульфонамид	JC5B-27(E11)
Пиперониламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Пиперониламин	Циклогексиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Аллиламин	JC5B-30(E12)
Циклогексиламин	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Этаноламин	Диаминобутан	Изобутиламин	Этаноламин	Диаминобутан	JC5B-28(E13)
Этаноламин	Пиперониламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Этаноламин	Метилбензиламин	Этаноламин	Диаминобутан	JC5B-29(E14)

Линкеры: диаминобутан, фурфуриламин, метионин

Фиг. 26

Скрининг библиотеки при СКВ



A. Нормальная контрольная сыворотка

B. Сыворотка при СКВ - Группа 1

C. Сыворотка при СКВ - Группа 2

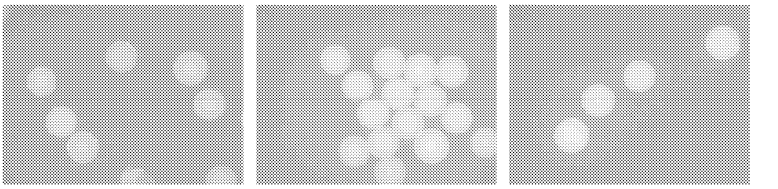
Фиг. 27

Активные соединения KN1B СКВ

Аллиламин	Изобутиламин	Диаминобутан	Бензиламин	Бензолсульфонамид	Глицин	Пирролидинон	Аллиламин	Диаминобутан	Цистеин	KN1B-14
Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Пипероniламин	Бензиламин	Диметоксифенетиламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Циклогексиламин	Диаминобутан	Цистеин	KN1B-15
Диаминобутан	Метилбензиламин	Бензиламин	Метилбензиламин	Бензиламин	Диаминобутан	Аллиламин	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Цистеин	KN1B-16
Бензиламин	Метилбензиламин	Бензиламин	Диаминобутан	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Диметоксифенетиламин	Бензолсульфонамид	Диаминобутан	Цистеин	KN1B-17
Метилбензиламин	Диаминобутан	Диметоксифенетиламин	Бензиламин	Циклогексиламин	Диаминобутан	Пипероniламин	Диаминобутан	Диаминобутан	Цистеин	KN1B-18
Диаминобутан	Пипероniламин	Бензиламин	Пипероniламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Аллиламин	Диаминобутан	Цистеин	KN1B-19
Диаминобутан	Пипероniламин	Бензиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Изобутиламин	Диметоксифенетиламин	Диаминобутан	Цистеин	KN1B-20
Метилбензиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Метилбензиламин	Диаминобутан	Метилбензиламин	Бензолсульфонамид	Метилбензиламин	Диаминобутан	Цистеин	KN1B-21
Диаминобутан	Циклогексиламин	Бензиламин	Диаминобутан	Бензиламин	Пипероniламин	Бензиламин	Пипероniламин	Диаминобутан	Цистеин	KN1B-22

Фиг. 28

Валидация активных соединений для пептоида KN1B-20

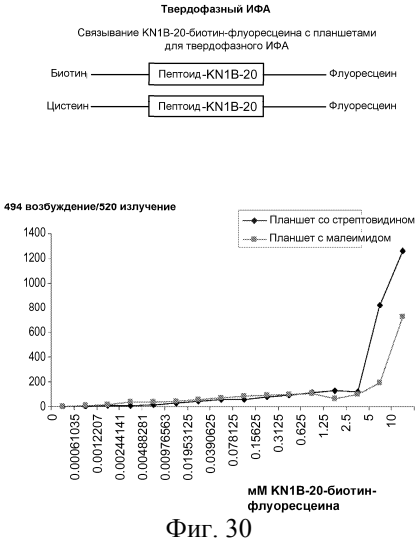


Объединенная сыворотка группы 1 (~0,374 мг/мл)

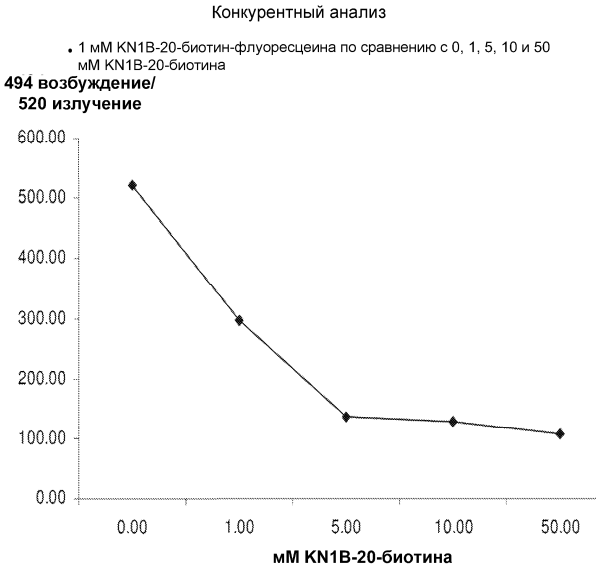
Объединенная сыворотка от здоровых субъектов (~0,378 мг/мл)

Без контрольной сыворотки

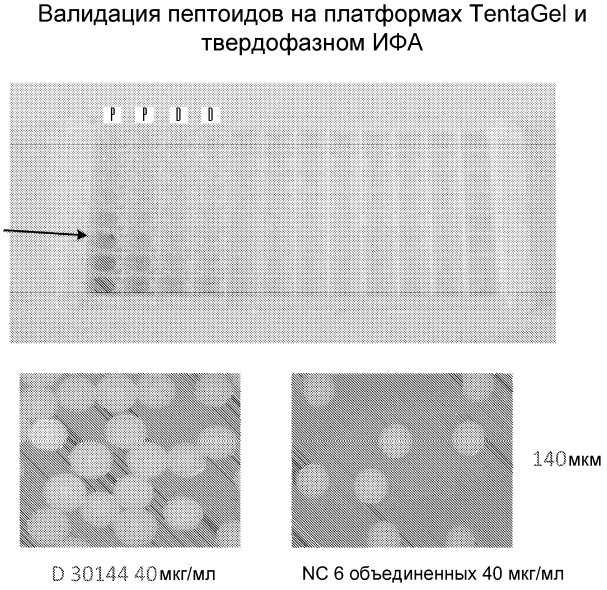
Фиг. 29



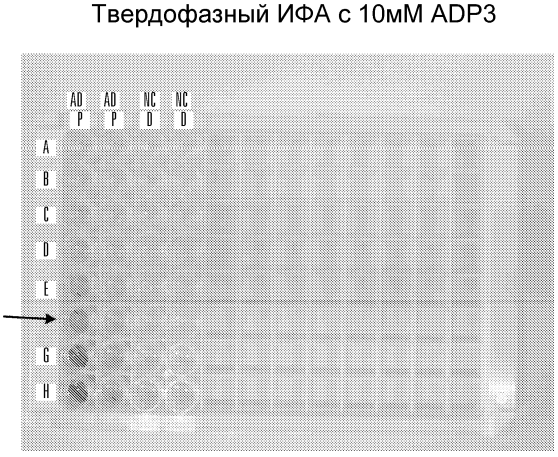
Фиг. 30



Фиг. 31

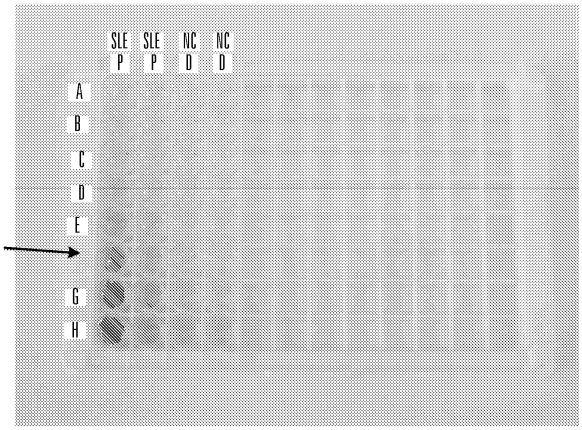


Фиг. 32



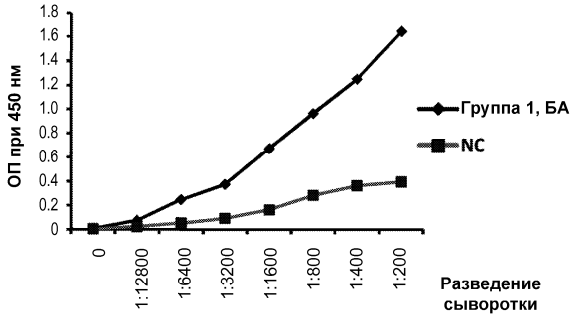
Фиг. 33

Твердофазный ИФА с 10мМ SLE-KN1B-20



Фиг. 34

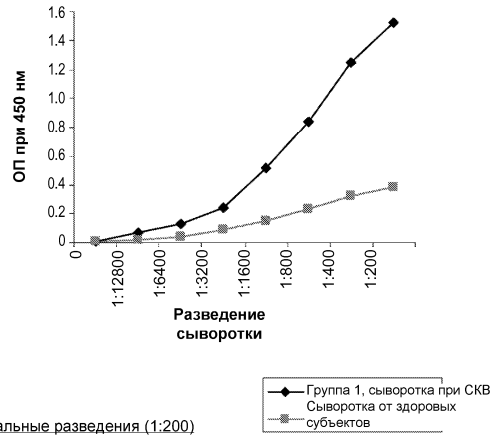
Твердофазный ИФА сыворотки при БА с 10 мМ ADP3
(в буфере для связывания)



Начальные разведения (1:200)
Группа 1, сыворотка при БА, ~0,394 мг/мл
Сыворотка от здоровых субъектов, ~0,386 мг/мл

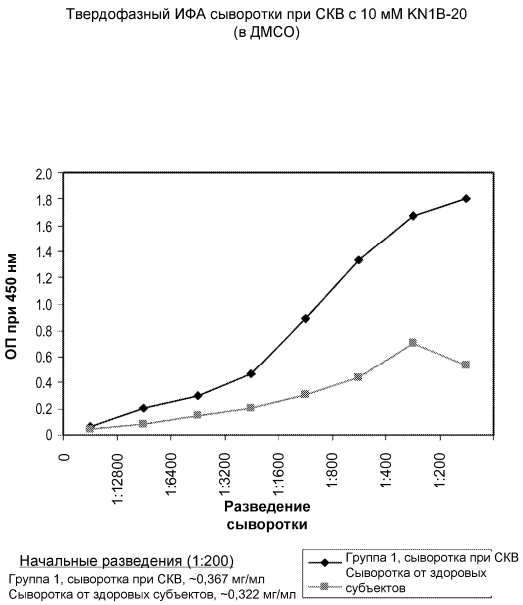
Фиг. 35

Твердофазный ИФА сыворотки при СКВ с 10 мМ KN1B-20
(в буфере для связывания)

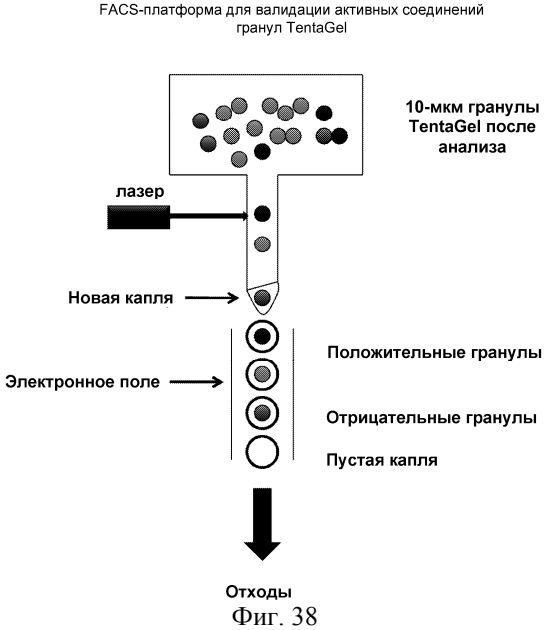


Начальные разведения (1:200)
Группа 1, сыворотка при СКВ, ~0,375 мг/мл
Сыворотка от здоровых субъектов, ~0,396 мг/мл

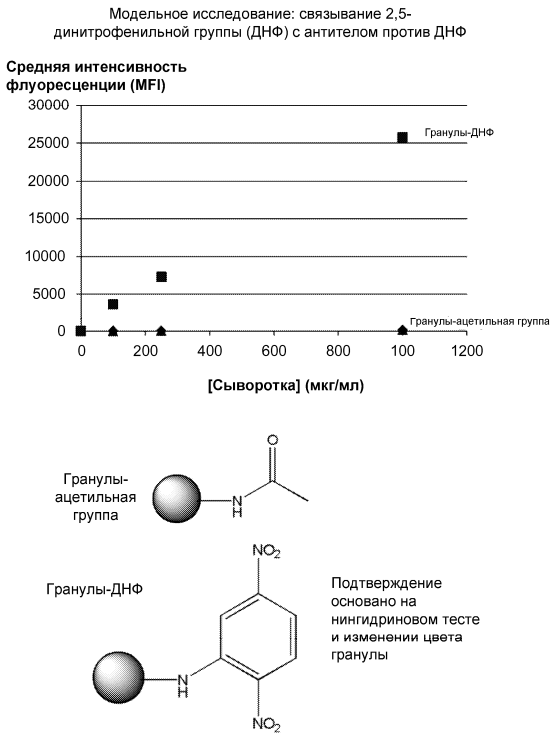
Фиг. 36


Твердофазный ИФА сыворотки при СКВ с 10 мМ KN1B-20
(в ДМСО)
ОП при 450 нм
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
1:12800
1:6400
1:3200
1:1600
1:800
1:400
1:200
Разведение сыворотки
Начальные разведения (1:200)
Группа 1, сыворотка при СКВ, ~0,367 мг/мл
Сыворотка от здоровых субъектов, ~0,322 мг/мл
Группа 1, сыворотка при СКВ
Сыворотка от здоровых субъектов

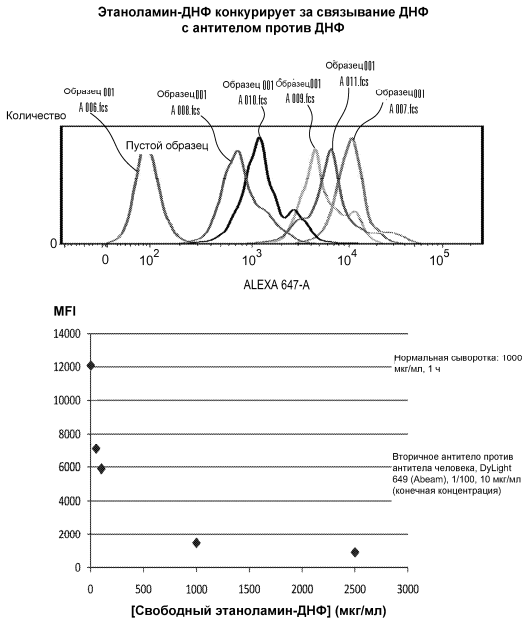
Фиг. 37


FACS-платформа для валидации активных соединений
гранул TentaGel
10-мкм гранулы TentaGel после анализа
лазер
Новая капля
Электронное поле
Положительные гранулы
Отрицательные гранулы
Пустая капля
Отходы

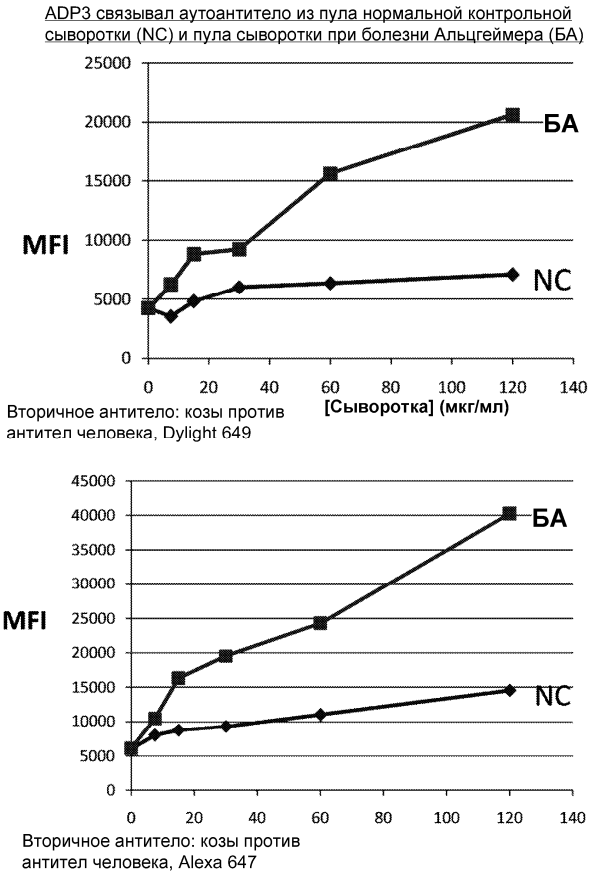
Фиг. 38


Модельное исследование: связывание 2,5-динитрофенильной группы (ДНФ) с антителом против ДНФ
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Гранулы-ДНФ
Гранулы-ацетильная группа
0
200
400
600
800
100
1200
[Сыворотка] (мкг/мл)
Гранулы-ацетильная группа
Гранулы-ДНФ
Подтверждение основано на нингидриновом тесте и изменении цвета гранулы

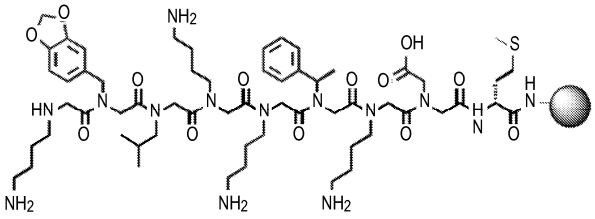
Фиг. 39


Этаноламин-ДНФ конкурирует за связывание ДНФ с антителом против ДНФ
Количество
Образец 001 A 006.fcs
Образец001 A 008.fcs
Образец 001 A 010.fcs
Образец001 A 009.fcs
Образец001 A 011.fcs
Образец001 A 007.fcs
Пустой образец
0
10^2
10^3
10^4
10^5
ALEXA 647-A
MFI
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Нормальная сыворотка: 1000 мкг/мл, 1 ч
Вторичное антитело против антитела человека, DyLight 649 (Abeam), 1/100, 10 мкг/мл (конечная концентрация)
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
[Свободный этаноламин-ДНФ] (мкг/мл)

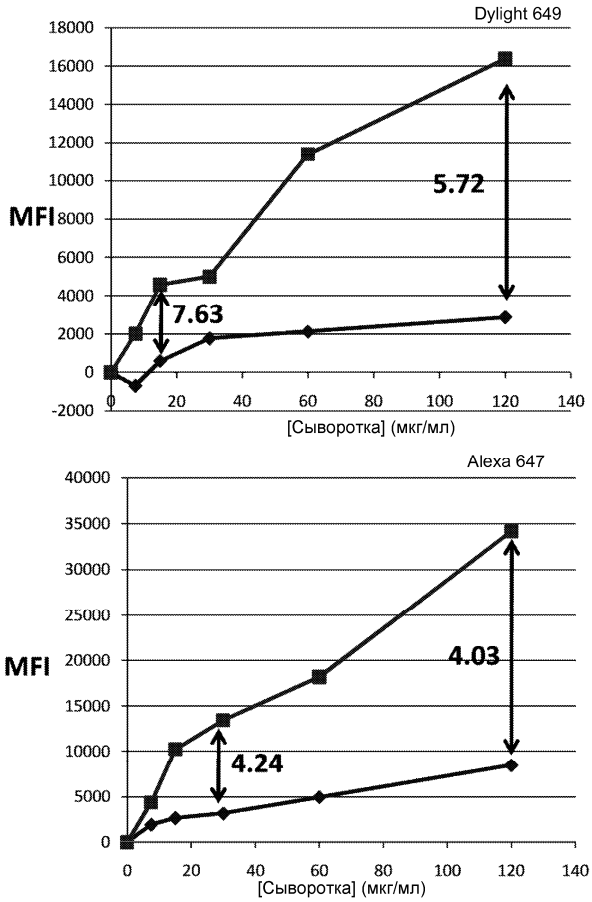
Фиг. 40



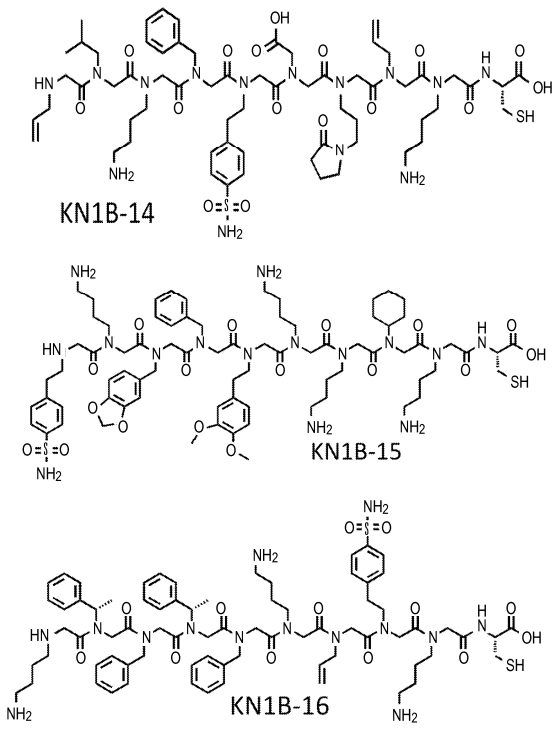
Фиг. 41A



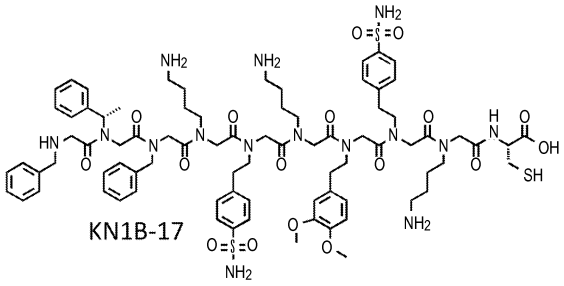
Фиг. 41B

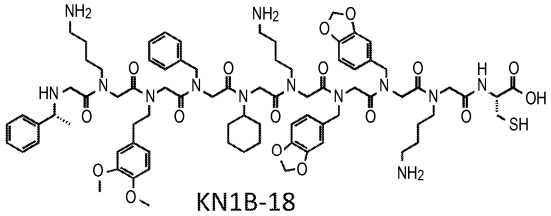


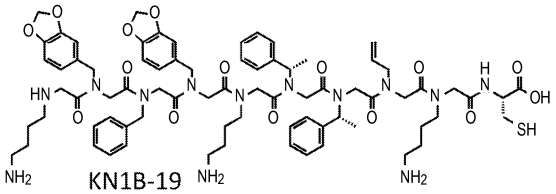
Фиг. 42



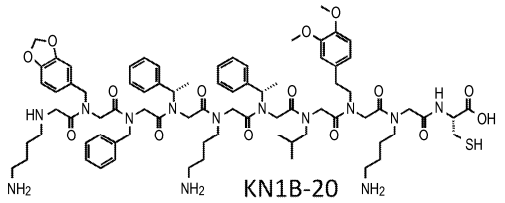
Фиг. 43А

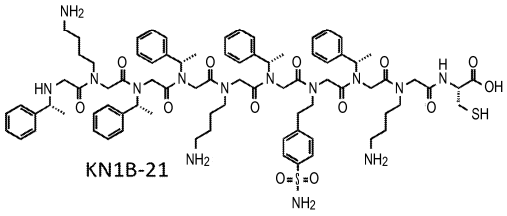


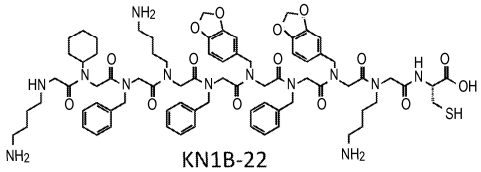




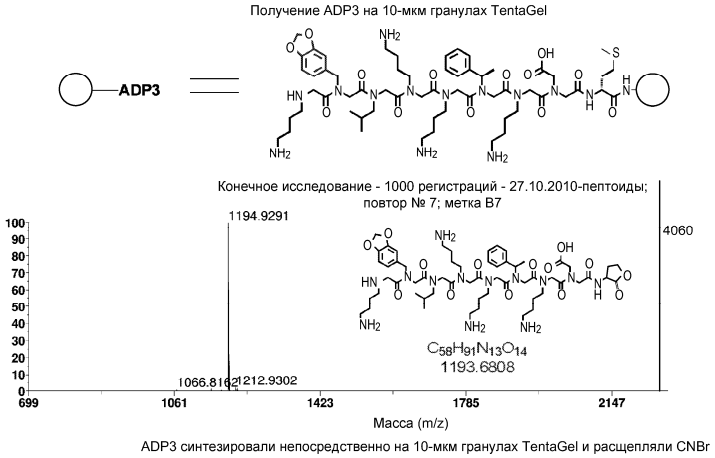
Фиг. 43B



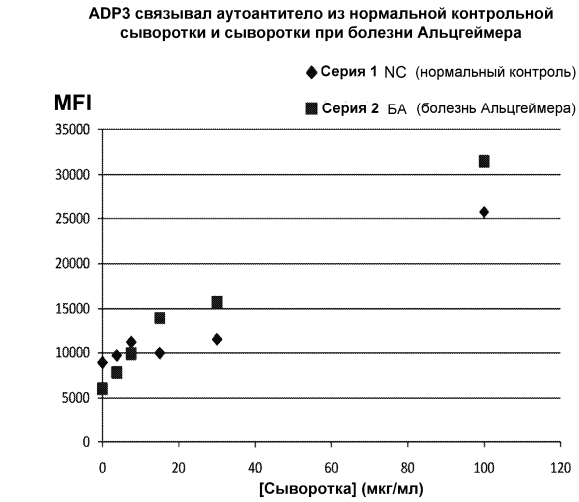




Фиг. 44



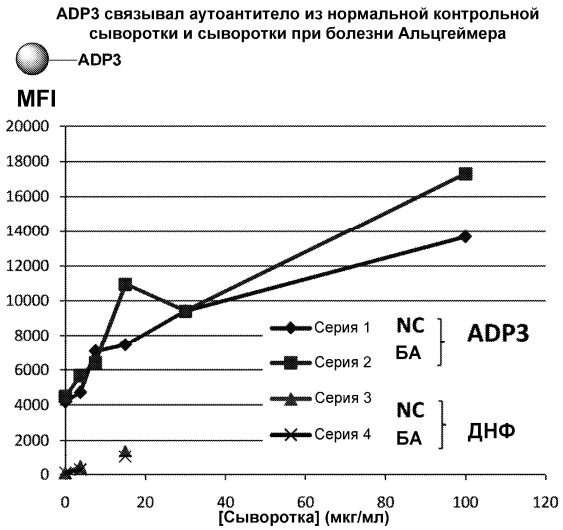
Фиг. 45



Предварительное блокирование гранул в течение 3 ч 1XTBST+ антитело козы против антител человека, Alexa 647

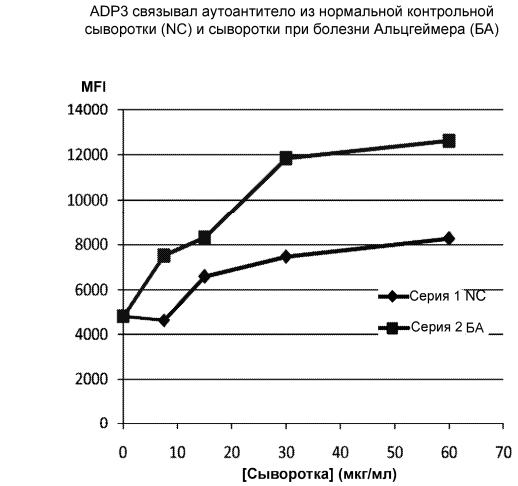
[Сыворотка] (мкг/мл)	0	3.75	7.5	15	30	100
NC	8956	9732	11195	9992	11516	25772
БА	6023	7841	9896	13928	15713	31489

Фиг. 46



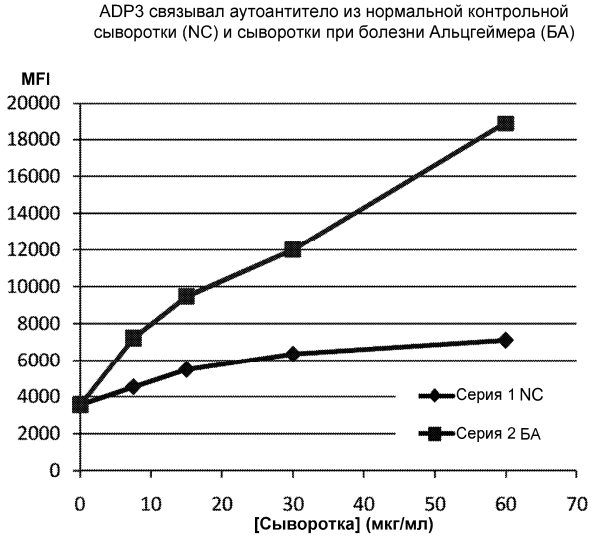
Блокирующий буфер + антитело козы против антител человека, Alexa 647

Фиг. 47



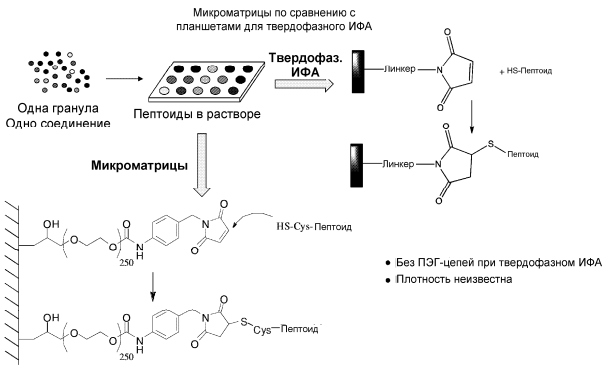
1. Предварительное блокирование лизатом E. coli + 0,5% лизином в течение 3 ч
2. Блокирующий буфер + антитело козы против антител человека, Alexa 647

Фиг. 48

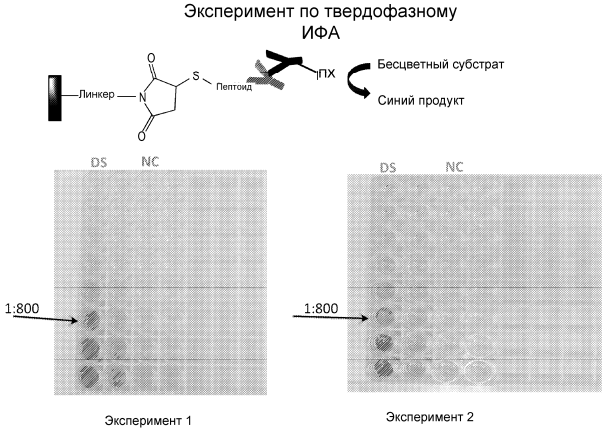


1. Предварительное блокирование лизатом E. coli + 1% лизином в течение 3 ч
2. Блокирующий буфер + антитело козы против антител человека, Alexa 647

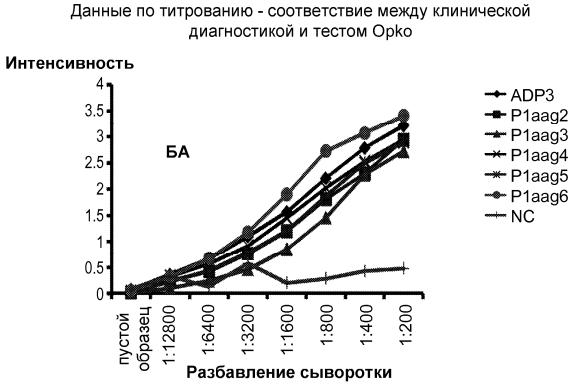
Фиг. 49



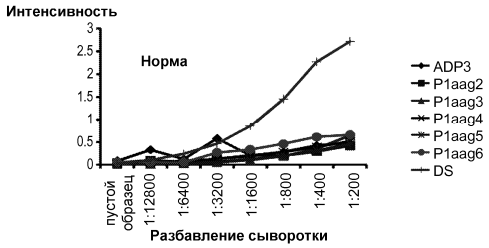
Фиг. 50



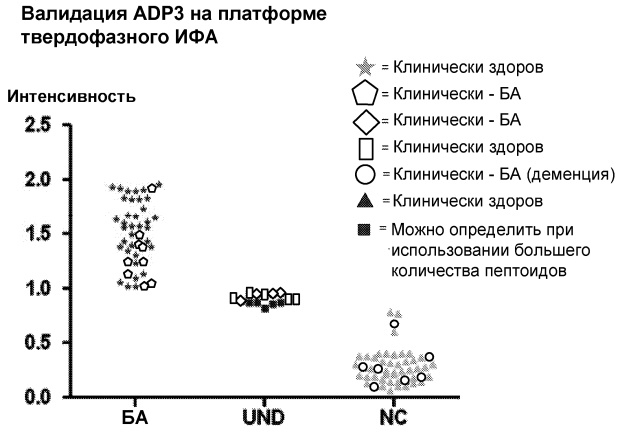
Фиг. 51



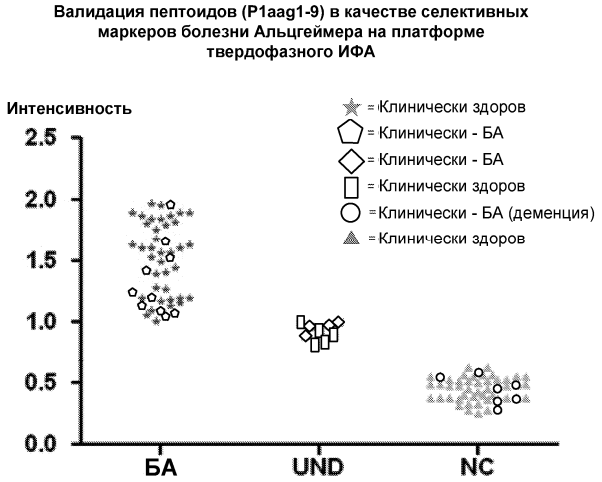
Фиг. 52A



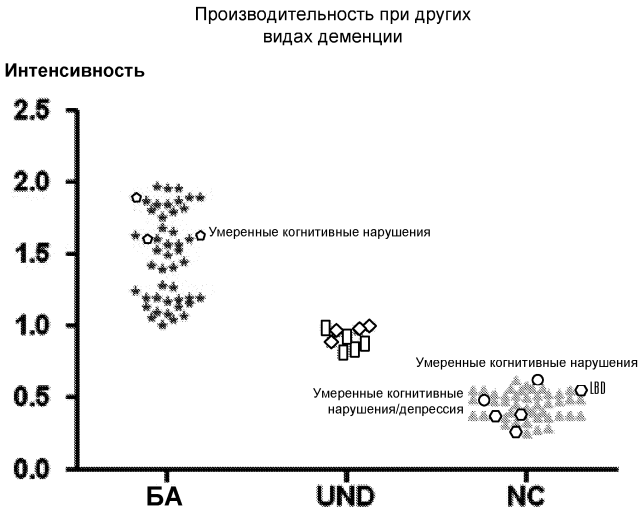
Фиг. 52B



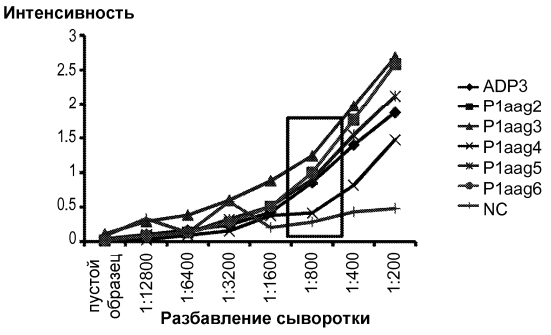
Фиг. 53



Фиг. 54

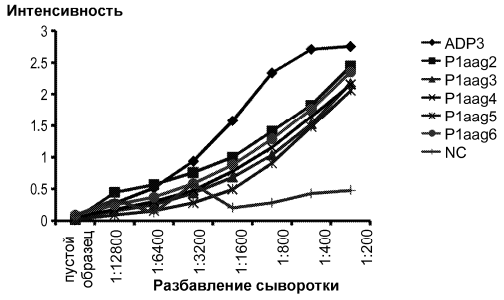


Фиг. 55



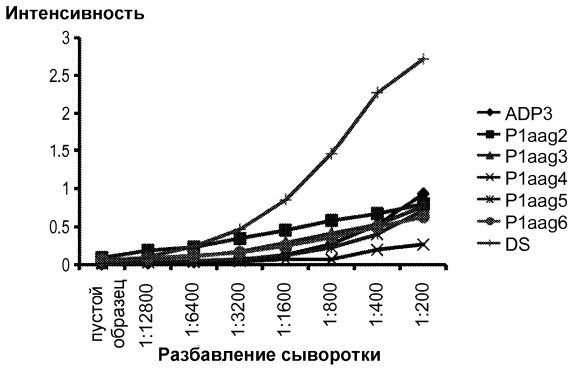
Клинически болен
Opko: состояние, предшествующее БА, даже по одной точке

Фиг. 56А



Клинически здоров (не страдает деменцией)
Opko: состояние, предшествующее БА, даже по одной точке

Фиг. 56B

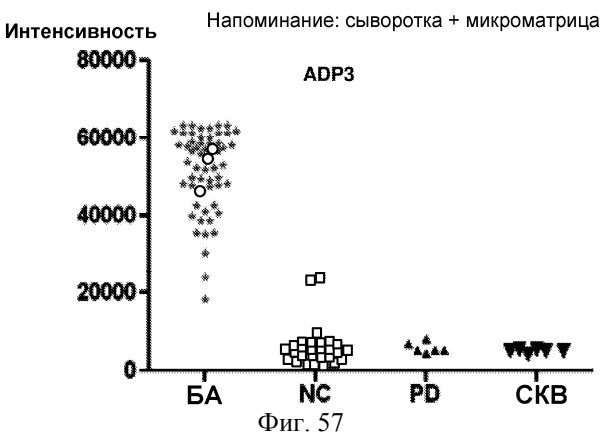


Клинически - БА (деменция)
Opko: Не БА, должно быть, другой вид деменции

Фиг. 56C

Клинически - БА (деменция)
Opko: UND по одной точке. UND даже после титрования.

Фиг. 56D

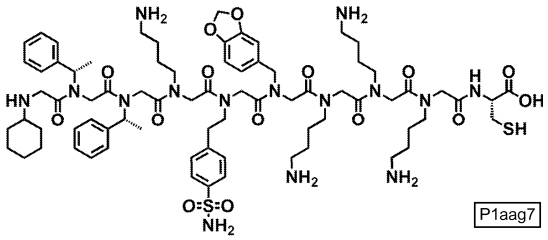


Фиг. 57

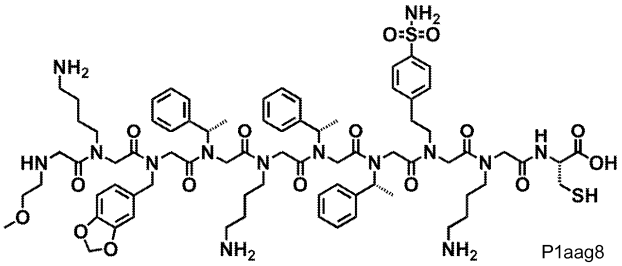
Сводная информация по твердофазному ИФА
Общее количество исследованных образцов плазмы = 106

Клинич. диагноз	Диагноз авт. изобр-я	Различия
49 пациентов с БА	42	7 (14%)
57 здор. субъектов	47	10 (17%)

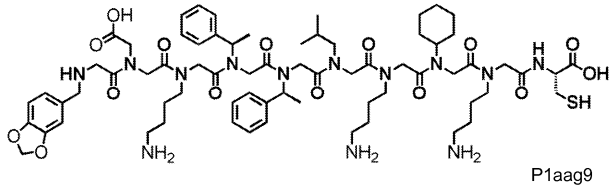
Фиг. 58



Фиг. 59A



Фиг. 59B



Фиг. 59C