

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190531** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.08.09

(22) Дата подачи заявки
2019.08.20

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)

(54) КОЛЛЕКЦИИ ПЕПТИДОВ, ПЕПТИДНЫЕ АГЕНТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/719,996**

(32) **2018.08.20**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/047206**

(87) **WO 2020/041270 2020.02.27**

(71) Заявитель:
ФОГ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:

**Макги Джон Хэнни, Томсон Тай
Мэттью, Валь Себастьян Кристоф
Теодор, Вердин Грегори Л., Резаен
Арагхи Рахелех, Чжан Юэ-Мэй,
Малвихилл Марк Джозеф (US)**

(74) Представитель:

**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Лебедев В.В.,
Парамонова К.В., Джермакян Р.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Костюшенкова М.Ю. (RU)**

(57) Данное изобретение предусматривает мощные технологии для разработки, получения, характеристики и/или применения композиций сшитых пептидов. Помимо прочего, данное изобретение предусматривает стратегии определения аминокислотных последовательностей, особенно подходящих или полезных для сшивки, а также технологии, реагенты и системы для разработки, получения, характеристики и/или применения сшитых пептидов, имеющих такие аминокислотные последовательности.

A1

202190531

202190531

A1

КОЛЛЕКЦИИ ПЕПТИДОВ, ПЕПТИДНЫЕ АГЕНТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка истребует приоритет по предварительной заявке на патент США 62/719996, поданной 20 августа 2018 г., которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ИЗВЕСТНЫЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[2] Сообщалось, что сшитые пептиды обладают улучшенными свойствами по сравнению с пептидами, не имеющими сшивок, и могут быть полезны для различных биологических целей.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[3] Данное изобретение предусматривает мощные технологии для разработки, получения, характеристики, и/или применения композиций сшитых пептидов. Помимо прочего, в данном описании представлены стратегии определения аминокислотных последовательностей, особенно подходящих или полезных для сшивки, а также технологии, реагенты и системы для разработки, получения, характеристики и/или применения сшитых пептидов, имеющих такие аминокислотные последовательности.

[4] Существующие технологии сшивания позволили разработать полезные и эффективные сшивающие пептиды, обычно с применением известной (и часто - встречающейся в природе) аминокислотной последовательности. Данное изобретение определяет источник проблемы, связанной с такими технологиями, которые неизбежно ограничены предварительно выбранными аминокислотными последовательностями. Помимо прочего, данное изобретение включает признание того, что определенные технологии сшивания цистеина могут быть реализованы в биологических системах (например, системах фагового дисплея), так что можно делать запросы множества пептидных последовательностей, что позволяет обеспечить высокопроизводительную генерацию и анализ сшитых пептидов, в том числе в отсутствие выбора predetermined или предпочтительной последовательности. Таким образом, например, в некоторых вариантах реализации данное изобретение позволяет разрабатывать сшитые пептиды (и их коллекции), которые связываются с конкретной мишенью, но имеют аминокислотную последовательность (последовательности), отличающиеся от (и, в некоторых вариантах реализации, не имеющие значительной идентичности с) взаимодействующим с данной

мишенью природным белковым партнером (партнерами), а в некоторых вариантах реализации - с мишенью, которая вообще не имеет известных белковых партнеров по взаимодействию. Таким образом, предлагаемые технологии позволяют идентифицировать аминокислотные последовательности, которые демонстрируют желательную характеристику (характеристики) связывания по отношению к конкретной мишени и, в частности, демонстрируют желательную характеристику (характеристики) связывания, когда они представлены в сшитой форме. Таким образом, данное изобретение предусматривает пептидные агенты, которые связываются с представляющей интерес мишенью, имеющие аминокислотную последовательность, идентифицированную, охарактеризованную и/или полученную, как описано в данном документе; в некоторых вариантах реализации такие пептидные агенты содержат сшитые пептиды.

[5] Как описано в данном документе, стратегии сшивания цистеина могут применяться для облегчения получения и/или характеристики сшитых пептидов в биологической системе или с ее помощью. В некоторых вариантах такое получение и/или характеристика могут включать идентификацию и/или выбор полезной аминокислотной последовательности. Специалисты в данной области, читающие данное изобретение, поймут, что после идентификации и/или выбора такой аминокислотной последовательности агент на основе сшитого пептида, имеющий такую аминокислотную последовательность, может быть получен с применением любой желаемой технологии сшивания.

[6] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает коллекцию пептидов (или кодирующих их нуклеиновых кислот), аминокислотные последовательности которых демонстрируют значительное разнообразие друг относительно друга и/или с эталонным природным белком. В некоторых вариантах реализации такие сшитые пептиды реализуются в (например, экспрессируются посредством и/или в) биологической системе (например, библиотеке фагового дисплея). В некоторых вариантах реализации пептиды коллекции имеют общую длину. В некоторых вариантах реализации пептиды коллекции имеют один или несколько общих элементов последовательности (например, обладающие идентичностью остатки, число и/или относительное расстояние между остатками цистеина и т.д.).

[7] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает коллекцию пептидов. В некоторых вариантах реализации коллекция пептидов представляет собой коллекцию сшитых пептидов. В некоторых вариантах реализации пептиды в коллекции, как описано в данном документе, могут иметь один или несколько общих структурных признаков (например, длину в определенном диапазоне; наличие

определенных элементов последовательности, таких как, например, элемент последовательности, обнаруженный у известного партнера по взаимодействию для мишени, представляющей интерес, или набор аминокислот, которые вместе поддерживают формирование сшивки [например, два или более остатков цистеина, расположенных друг относительно друга таким образом, чтобы между ними образовывалась или могла образовываться цистеиновая сшивка, как описано в данном документе], наличие одной или нескольких сшивок, которые в некоторых вариантах реализации могут быть одного типа и т.д., или любую их комбинацию, и в некоторых вариантах реализации конкретная коллекция может быть охарактеризована и/или определена с помощью такого общего структурного признака (признаков)). В некоторых вариантах реализации общий структурный признак пептидов в коллекции пептидов, как описано в данном документе, представляет собой или по меньшей мере два остатка цистеина, расположенных относительно друг друга так, чтобы между ними образовывалась или могла образовываться цистеиновая сшивка, как описано в данном документе; в некоторых вариантах реализации такие пептиды могут взаимодействовать с соединением формулы R-I с образованием коллекции пептидов с цистеиновыми сшивками.

[8] В некоторых вариантах реализации предусматриваемая коллекция пептидов представляет собой коллекцию сшитых пептидов, каждый из которых независимо имеет аминокислотную последовательность, которая:

имеет длину в диапазоне от a^* до b^* , где a^* и b^* представляют собой каждое целое число, независимо выбранное из 2-100, и b^* больше a^* ; и

включает по меньшей мере одну пару остатков, ковалентно связанных друг с другом через линкер.

[9] В некоторых вариантах реализации предусматриваемая коллекция пептидов (или кодирующих их нуклеиновых кислот) отличается тем, что все пептиды коллекции включают остатки цистеина (например, пару остатков цистеина), расположенные на расстоянии друг от друга, позволяющем обеспечить цистеиновые сшивки, как описано в данном документе, но в остальном имеют независимые аминокислотные последовательности и, необязательно, тем, что все пептиды этой коллекции имеют одинаковую длину. В некоторых таких вариантах реализации остатки цистеина расположены в соответствующих положениях в каждом из пептидов. В некоторых вариантах реализации все положения в коллекции, кроме остатков цистеина, являются вырожденными (т.е. разные пептиды в коллекции могут иметь разные остатки в любом заданном положении); в некоторых таких вариантах реализации одно или несколько

положений в коллекции являются полностью вырожденными в том смысле, что каждая используемая аминокислота (например, каждая природная аминокислота) включена в указанном положении в по меньшей мере одном пептиде в коллекции. В некоторых вариантах реализации каждое положение, кроме цистеинов, является полностью вырожденным по всей коллекции. В некоторых вариантах реализации одно или несколько положений в коллекции имеют предпочтения в том смысле, что множество различных аминокислот, каждая из которых выбрана из ограниченного набора (т.е. меньшего, чем все возможные аминокислотные остатки, и, в некоторых вариантах реализации, меньшего, чем все природные аминокислоты). В некоторых вариантах реализации вырожденность и/или предпочтения вносятся в одно или несколько положений посредством генной инженерии и/или экспрессии выбранных последовательностей нуклеиновых кислот в биологической системе. В некоторых вариантах реализации степень вырожденности или предпочтения в одном или нескольких положениях в пептидах коллекции или библиотеки пептидов, как описано в данном документе, обосновывают и/или выбирают путем предварительной оценки одной или нескольких характеристик связывания родственной библиотеки или коллекции (например, со сравнимыми остатками цистеина). В некоторых вариантах реализации такая предварительная оценка осуществляется путем высокопроизводительного анализа (например, скрининга) коллекции или коллекций сшитых цистеином пептидов против представляющей интерес мишени, и применение высокопроизводительного секвенирования для декодирования генотипов подмножества коллекции пептидов может дать информацию для получения библиотеки с предпочтением.

[10] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает технологии для идентификации, характеристики и/или получения сшитых пептидных агентов, которые связывают представляющую интерес мишень. В некоторых вариантах реализации предусматриваемые технологии включают контактирование представляющей интерес мишени с коллекцией пептидов (например, коллекцией сшитых пептидов; в некоторых вариантах реализации пептиды коллекции имеют один или несколько общих структурных признаков) и определение одной или нескольких характеристик (например, скорость ассоциации, скорость диссоциации, аффинность [например, при одной или нескольких концентрациях], специфичность, кривая связывания и т.д.) взаимодействия между индивидуальным пептидом (пептидами) и мишенью. В некоторых вариантах реализации такое определение включает сравнение с соответствующим эталоном (например, положительным или отрицательным контролем, таким как ранее известное или охарактеризованное взаимодействие между мишенью и известным взаимодействующим

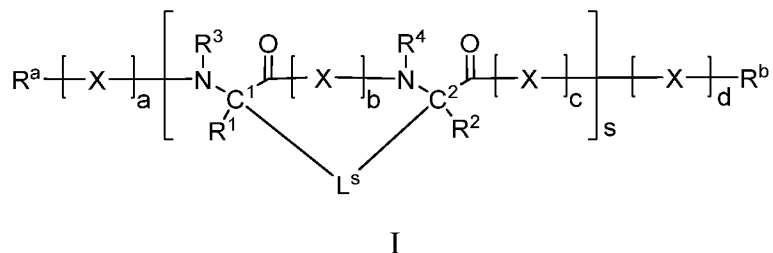
агентом или между различными взаимодействующими партнерами).

[11] В некоторых вариантах реализации представляющая интерес мишень может быть природным эпитопом (например, представляющим собой или содержащим полипептид, гликан и т.д.) или содержать его. В некоторых вариантах реализации представляющая интерес мишень является мишенью, для которой естественный партнер взаимодействия неизвестен. В некоторых вариантах реализации представляющая интерес мишень является мишенью, для которой известен естественный партнер по взаимодействию (и, например, желательно идентифицировать альтернативного партнера по взаимодействию - например, такого, который может конкурировать с известным партнером по взаимодействию - и/или желательно идентифицировать альтернативный формат известного партнера по взаимодействию).

[12] В некоторых вариантах реализации предусматриваемые технологии могут обеспечивать и/или применять систему экспрессии фага, в которой пептиды-кандидаты (например, имеющие аминокислотные последовательности, которые включают по меньшей мере два остатка цистеина, расположенные друг относительно друга таким образом, чтобы поддерживать сшивание цистеина, как описано в данном документе) продуцируются в виде слитых белков с фаговой оболочкой (например, белок рIII).

[13] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает технологии для разработки (например, идентификации и/или характеристики), получения и/или применения сшитых пептидных агентов, которые связываются с представляющей интерес мишенью, необязательно, с одной или несколькими заранее определенными характеристиками связывания. В некоторых таких вариантах реализации один или несколько сконструированных, полученных и/или охарактеризованных (например, посредством анализа с применением фагового дисплея, как описано в данном документе) сшитых цистеином пептидов модифицируют с целью замены цистеиновой сшивки на нецистеиновую сшивку. Таким образом, в некоторых вариантах реализации, технологии сшивания цистеина используют для идентификации и/или характеристики пептидов (т.е. аминокислотных последовательностей пептидов и/или других структур), которые могут быть сшиты с получением стабильной структуры с одним или несколькими желаемыми атрибутами связывания. Такие пептиды могут быть переформатированы в соответствии с данным изобретением в соответствующие пептиды, в которых цистеиновая сшивка заменена нецистеиновой сшивкой (например, необязательно, помимо прочего, путем замены остатков цистеина, участвующих в сшивке (сшивках), на другие остатки, пригодные для применения в альтернативных технологиях сшивания (например, сшивание углеводов, сшивание гетероатомов и т.д.).

[14] В некоторых вариантах реализации технологии, предусмотренные данным изобретением, относятся к пептидам (например, индивидуальным пептидам и/или пептидным коллекциям), имеющим структуру формулы I:



или их солям, где:

каждый из R^a , R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо представляют собой R' ;

R^b представляет собой R' , $-\text{OR}'$ или $-\text{N}(\text{R}')_2$;

каждый X независимо представляет собой аминокислотный остаток;

каждый из a , b , c и d независимо обозначает целое число от 1 до 20 включительно;

каждый из C^1 и C^2 независимо представляет собой атом углерода;

L^s представляет собой $-\text{L}^{s1}-\text{S}-\text{L}^{s2}-\text{S}-\text{L}^{s3}-$;

L^{s1} и L^{s3} каждый независимо представляет собой L;

L^{s2} представляет собой L и содержит по меньшей мере один $-\text{C}(\text{O})-$; и

каждый L независимо представляет собой ковалентную связь или необязательно замещенную двухвалентную $\text{C}_1\text{-C}_{25}$ алифатическую группу, в которой одно или несколько метиленовых звеньев алифатической группы необязательно и независимо заменены на $-\text{C}(\text{R}')_2-$, $-\text{Cy}-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{S})-$, $-\text{C}(\text{NR}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ или $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$;

каждый $-\text{Cy}-$ независимо представляет собой необязательно замещенную двухвалентную группу, выбранную из C_{3-20} циклоалифатического кольца, C_{6-20} арильного кольца, 5-20-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3-20-членного гетероциклического кольца, содержащего 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния;

каждый R' независимо представляет собой $-\text{R}$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}$, $-\text{CO}_2\text{R}$ или $-\text{SO}_2\text{R}$;

каждый R независимо представляет собой $-\text{H}$ или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-30} алифатической группы, C_{1-30} гетероалифатической группы, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, C_{6-30} арила, C_{6-30} арилалифатической группы, C_{6-30} арилгетероалифатической группы, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, 5-30-членного гетероарила, содержащего 1-

10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния и 3-30-членной гетероциклической группы, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, или

две группы R, необязательно и независимо, вместе образуют ковалентную связь; или две или более групп R на одном и том же атоме, необязательно и независимо, вместе с указанным атомом образуют необязательно замещенное 3-30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее, помимо указанного атома, 0-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния; или две или более групп R на двух или нескольких атомах, необязательно и независимо, вместе с промежуточными атомами между ними, образуют необязательно замещенное 3-30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее, в дополнение к промежуточным атомам, 0-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния.

[15] В некоторых вариантах реализации R^a представляет собой R' , где R' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации R^a представляет собой -H. В некоторых вариантах реализации R^a представляет собой R-C(O)-.

[16] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает коллекцию сшитых пептидов, причем каждый из сшитых пептидов независимо имеет структуру формулы I или ее соли.

[17] В некоторых вариантах реализации a равно 1. В некоторых вариантах реализации a равно 2. В некоторых вариантах реализации a равно 3. В некоторых вариантах реализации a равно 4. В некоторых вариантах реализации a равно 5. В некоторых вариантах реализации a равно 6. В некоторых вариантах реализации a равно 7. В некоторых вариантах реализации a равно 8. В некоторых вариантах реализации a равно 9. В некоторых вариантах реализации a равно 10. В некоторых вариантах реализации a равно 11. В некоторых вариантах реализации a равно 12. В некоторых вариантах реализации a равно 13. В некоторых вариантах реализации a равно 14. В некоторых вариантах реализации a равно 15. В некоторых вариантах реализации a равно 16. В некоторых вариантах реализации a равно 17. В некоторых вариантах реализации a равно 18. В некоторых вариантах реализации a равно 19. В некоторых вариантах реализации a равно 20.

[18] В некоторых вариантах реализации, R^1 представляет собой R' , как описано в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, R^1 представляет собой R, как описано в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации R^1 представляет

реализации c равно 13. В некоторых вариантах реализации c равно 14. В некоторых вариантах реализации c равно 15. В некоторых вариантах реализации c равно 16. В некоторых вариантах реализации c равно 17. В некоторых вариантах реализации c равно 18. В некоторых вариантах реализации c равно 19. В некоторых вариантах реализации c равно 20.

[26] В некоторых вариантах реализации s равно 1-5. В некоторых вариантах реализации s равно 1. В некоторых вариантах реализации s равно 2. В некоторых вариантах реализации s равно 3. В некоторых вариантах реализации s равно 4. В некоторых вариантах реализации s равно 5.

[27] В некоторых вариантах реализации d равно 1. В некоторых вариантах реализации d равно 2. В некоторых вариантах реализации d равно 3. В некоторых вариантах реализации d равно 4. В некоторых вариантах реализации d равно 5. В некоторых вариантах реализации d равно 6. В некоторых вариантах реализации d равно 7. В некоторых вариантах реализации d равно 8. В некоторых вариантах реализации d равно 9. В некоторых вариантах реализации d равно 10. В некоторых вариантах реализации d равно 11. В некоторых вариантах реализации d равно 12. В некоторых вариантах реализации d равно 13. В некоторых вариантах реализации d равно 14. В некоторых вариантах реализации d равно 15. В некоторых вариантах реализации d равно 16. В некоторых вариантах реализации d равно 17. В некоторых вариантах реализации d равно 18. В некоторых вариантах реализации d равно 19. В некоторых вариантах реализации d равно 20.

[28] В некоторых вариантах реализации, R^b представляет собой R' , как описано в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, R^b представляет собой R , как описано в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации R^b представляет собой $-H$. В некоторых вариантах реализации R^b представляет собой $-OR'$, где R' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации R^b представляет собой $-OH$. В некоторых вариантах реализации R^b представляет собой $-N(R')_2$, где каждый R' независимо имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации R^b представляет собой $-NH(R')$, где R' независимо имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, R^b представляет собой $-NH_2$, где R' независимо имеет значения, описанные в данном изобретении.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[29] Фиг. 1. Спектр 1H ЯМР очищенного линкера 3 (см. Пример 1).

- [30] Фиг. 2. Спектр ^1H ЯМР очищенного линкера 4 (см. Пример 1).
- [31] Фиг. 3. Спектр ^1H ЯМР очищенного линкера 5 (см. Пример 1).
- [32] Фиг. 4. Спектр ^1H ЯМР очищенного линкера 6 (см. Пример 1).
- [33] Фиг. 5. Спектр ^1H ЯМР очищенного линкера 7 (см. Пример 1).
- [34] Фиг. 6. Спектр ^1H ЯМР очищенного линкера 8 (см. Пример 1).
- [35] Фиг. 7. Спектр ^1H ЯМР очищенного линкера 9 (см. Пример 1).
- [36] Фиг. 8. Зависимость эффективности конверсии сшивания от времени, охарактеризованная методом ЖХ-МС, для линкеров 1-9 с пептидными производными xStAx41, содержащими цистеины в положениях (i, i+4) или (i, i+7); xStAx41 представляет собой пептид, описанный в Grossman et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(44), 174942-17947.
- [37] Фиг. 9. Зависимость средней нормированной поляризации флуоресценции от концентрации пептида, определенная с помощью флуоресцентного планшет-ридера. Каждая точка данных представляет собой среднее значение трех определений поляризации флуоресценции. Используемые пептиды представляли собой связывающие и не связывающие производные xStAx41, сшитые в положениях (i, i+4) или (i, i+7) линкерами 1-9.
- [38] Фиг. 10. Сводные данные по аффинности связывания связывающих и несвязывающих производных xStAx41, сшитых в положениях (i, i+4) или (i, i+7) линкерами 1-9. Значения выражены в микромолях.
- [39] Фиг. 11. Кривые регистрации жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии для i) панели А: трипсинизированный ACILDCNIQR, слитый с белком оболочки фага рIII, сшитый линкером 9; и панели В: трипсинизированный ACILDAHICR, слитый с белком оболочки фага рIII, сшитый линкером 7.
- [40] Фиг. 12. Анализ кластеров последовательностей, идентифицированных при скрининге на бета-катенин, с применением комбинации метода введения контрольного зонда («spike-in») и добавления известного конкурента к сайту связывания Axin/TCF бета-катенина для определения влияния добавления конкурента на сигнал связывания кластера. На левой панели показана ящичковая диаграмма силы связывания десяти кластеров, которые были идентифицированы при скрининге на β -катенин. На средней панели показано то же самое, но с добавленным известным конкурентом сайта связывания Axin/TCF. У пяти кластеров сигнал связывания значительно снижается, указывая на то, что они, вероятно, конкурируют с одним и тем же сайтом связывания на бета-катенине. На правой панели показано *in vitro* поведение связывания репрезентативного пептида из крайнего левого кластера и третьего справа кластера в анализе измерения конкуренции со

связывающими агентами с сайтом связывания Axin/TCF, демонстрирующее, что предсказанное поведение связывания соответствует измеренному *in vitro* поведению связывания.

[41] Фиг. 13. Библиотека (ADPAXXXCXXAAXXCXXX) была сшита с помощью линкера 7 и подвергнута скринингу на бета-катенин. Панель A: Профиль доза-ответ для 15 верхних связывающих последовательностей трех различных белков-мишеней и «холостых» бусин, демонстрирующий специфичность связывания бета-катенина. Серые линии используются для соединения результатов подсчета для каждой последовательности при одинаковых экспериментальных условиях концентрации мишеней. Панели B-D: Символьные обозначения последовательностей (B), профиль доза-ответ (C) и ящичковая диаграмма профиля доза-ответ (D) показаны для верхних 5, верхних 10, верхних 15 и всех последовательностей в кластере (сверху вниз) на основе эффективного значения IC50. Серые ящичковые диаграммы в нижней части панели D показывают распределение количества последовательностей, не включенных в кластеризацию, которые соответствуют мотиву последовательности, показанному на панели A. Панель E: Последовательность, эффективное значение IC50, последовательность с разбивкой по аминокислотам, и результаты подсчетов для каждой концентрации бета-катенина.

[42] Фиг. 14. Библиотека (ADPAXXXCXXAAXXCXXX) была сшита с помощью линкера 7 и подвергнута скринингу на бета-катенин. Панель A: Подсчет элюированных фагов для последовательностей из кластера последовательностей. Черные линии соединяют результаты подсчетов для каждой последовательности при различных концентрациях мишени. Серые линии используются для соединения результатов подсчета для каждой последовательности при одинаковых экспериментальных условиях концентрации мишеней. Панели B-D: Символьные обозначения последовательностей (B), профиль доза-ответ (C) и ящичковая диаграмма профиля доза-ответ (D) показаны для верхних 5, верхних 10, верхних 15 и всех последовательностей в кластере (сверху вниз) на основе эффективного значения IC50. Серые ящичковые диаграммы в нижней части панели D показывают распределение количества последовательностей, не включенных в кластеризацию, которые соответствуют мотиву последовательности, показанному на панели A. Панель E: Последовательность, эффективное значение IC50, последовательность с разбивкой по аминокислотам, и результаты подсчетов для каждой концентрации бета-катенина. Соединение 1 было идентифицировано как возможный агент, связывающийся с бета-катенином.

[43] Фиг. 15. Библиотека (ADPAXXXCXXAAXXCXXX) была сшита с помощью

линкера 7 и подвергнута скринингу на бета-катенин. Панель А: Подсчет элюированных фагов для последовательностей из кластера последовательностей. Черные линии соединяют результаты подсчетов для каждой последовательности при различных концентрациях мишени. Серые линии используются для соединения результатов подсчета для каждой последовательности при одинаковых экспериментальных условиях концентрации мишеней. Панели В-Д: Символьные обозначения последовательностей (В), профиль доза-ответ (С) и ящичковая диаграмма профиля доза-ответ (D) показаны для верхних 5, верхних 10, верхних 15 и всех последовательностей в кластере (сверху вниз) на основе эффективного значения IC₅₀. Серые ящичковые диаграммы в нижней части панели D показывают распределение количества последовательностей, не включенных в кластеризацию, которые соответствуют мотиву последовательности, показанному на панели А. Панель Е: Последовательность, эффективное значение IC₅₀, последовательность с разбивкой по аминокислотам, и результаты подсчетов для каждой концентрации бета-катенина. Соединение 2 было идентифицировано как возможный агент, связывающийся с бета-катенином.

[44] Фиг. 16. Примеры аффинности связывания для очищенных Соединений 1 и 2, химически синтезированных путем твердофазного пептидного синтеза и сшитых линкером 7 (т.е. не отображаемых на фаге), с применением системы Biacore.

[45] Фиг. 17. Кривые конкурентной поляризации флуоресценции для восьми выбранных пептидов. По оси Y отложены миллиединицы поляризации (mP), а по оси X - концентрация пептида. По мере добавления увеличивающегося количества пептида значения mP снижаются, так как FITC-меченый пептидный зонд вытесняется из белка бета-катенина.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[46] Если не указано иное, в данном документе должны применяться следующие определения. В целях данного описания химические элементы идентифицируются в соответствии с Периодической таблицей химических элементов, версия CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed. Кроме того, общие принципы органической химии описаны в "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, и "March's Advanced Organic Chemistry", 5th Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001.

[47] *Введение:* Используемый в данном документе термин «введение» обычно относится к введению композиции субъекту или в систему. Специалистам в данной области техники будут известны различные пути, которые при соответствующих обстоятельствах могут применяться для введения субъекту, например, человеку. Например, в некоторых вариантах реализации введение может быть глазным, пероральным, парентеральным, местным *и т. д.* В некоторых конкретных вариантах реализации введение может быть бронхиальным (*например*, путем инстилляций в бронхи), буккальным, дермальным (которое может представлять собой или включать, например, одно или несколько из местного нанесения на кожу, внутрикожного, интердермального, трансдермального *и т.д.*), энтеральным, интраартериальным, внутрикожным, внутрижелудочным, интрамедуллярным, внутримышечным, интраназальным, интраперитонеальным, интратекальным, внутривенным, внутрижелудочковым, в конкретный орган (например, внутripеченочным), мукозальным, назальным, пероральным, ректальным, подкожным, сублингвальным, местным, трахеальным (*например*, путем интратрахеальной инстилляций), вагинальным, витреальным *и т.д.* В некоторых вариантах реализации введение может предусматривать прерывистое введение дозы (*например*, множество доз, разделенных во времени) и/или периодическое введение дозы (*например*, индивидуальные дозы, разделенные общим периодом времени). В некоторых вариантах реализации введение может включать непрерывное введение дозы (*например*, перфузию) в течение по меньшей мере выбранного периода времени.

[48] *Агент:* Как правило, термин «агент» в данном документе может применяться по отношению к соединению или объекту, принадлежащему к любому классу химических соединений, включая, например, полипептид, нуклеиновую кислоту, сахарид, липид, малую молекулу, металл или их комбинацию или комплекс. Как будет понятно из контекста специалистам в данной области техники, этот термин в соответствующих обстоятельствах можно применять по отношению к объекту, который представляет собой или содержит клетку или организм, или их фракцию, экстракт или компонент. Альтернативно или дополнительно, как будет понятно из контекста, этот термин может использоваться по отношению к натуральному продукту, в том смысле, что он присутствует в природе и/или был получен из природы. В некоторых случаях, опять же, как будет ясно из контекста, этот термин может использоваться для обозначения одного или нескольких объектов искусственного происхождения, в том смысле, что они были спроектированы, сконструированы и/или созданы человеком и/или не встречаются в природе. В некоторых вариантах реализации агент можно применять в выделенной или чистой форме; в некоторых вариантах реализации агент можно использовать в

неочищенной форме. В некоторых вариантах реализации могут быть предусмотрены агенты в виде коллекций или библиотек, которые, например, могут быть подвергнуты скринингу с целью идентификации или характеристики активных агентов, входящих в их состав. В некоторых случаях термин «агент» может относиться к соединению или объекту, который представляет собой или содержит полимер; в некоторых случаях термин может относиться к соединению или объекту, который содержит один или несколько полимерных фрагментов. В некоторых вариантах реализации термин «агент» может относиться к соединению или объекту, который не является полимером и/или практически не содержит каких-либо полимеров и/или одного или нескольких конкретных полимерных фрагментов. В некоторых вариантах реализации указанный термин может относиться к соединению или объекту, в котором отсутствует или практически отсутствует какой-либо полимерный фрагмент. В некоторых вариантах реализации агент представляет собой соединение. В некоторых вариантах реализации агент представляет собой сшитый пептид.

[49] *Алифатический*: При использовании в данном документе, «алифатический» означает линейную (*m.e.*, неразветвленную) или разветвленную, замещенную или незамещенную углеводородную цепь, которая является полностью насыщенной или содержит одну или несколько единиц ненасыщенности, или замещенное или незамещенное моноциклическое, бициклическое или полициклическое углеводородное кольцо, которое является полностью насыщенным или содержит одну или несколько единиц ненасыщенности, или их комбинации. Если не указано иное, алифатические группы содержат 1-100 алифатических атомов углерода. В некоторых вариантах реализации алифатические группы содержат 1-20 алифатических атомов углерода. В некоторых вариантах реализации алифатические группы содержат 1-10 алифатических атомов углерода. В некоторых вариантах реализации алифатические группы содержат 1-9 алифатических атомов углерода. В некоторых вариантах реализации алифатические группы содержат 1-8 алифатических атомов углерода. В некоторых вариантах реализации алифатические группы содержат 1-7 алифатических атомов углерода. В некоторых вариантах реализации алифатические группы содержат 1-6 алифатических атомов углерода. В еще других вариантах реализации алифатические группы содержат 1-5 алифатических атомов углерода, и в еще других вариантах реализации алифатические группы содержат 1, 2, 3 или 4 алифатических атома углерода. Подходящие алифатические группы включают, без ограничений, линейные или разветвленные, замещенные или незамещенные алкильные, алкенильные, алкинильные группы и их гибриды.

[50] *Алкенил*: Используемый в данном документе термин «алкенил» относится к алифатической группе, как определено в данном документе, имеющей одну или несколько двойных связей.

[51] *Алкенилен*: Термин «алкенилен» относится к двухвалентной алкенильной группе.

[52] *Алкил*: Используемый в данном документе термин «алкил» имеет обычное значение в данной области техники и может включать насыщенные алифатические группы, включая алкильные группы с прямой цепью, алкильные группы с разветвленной цепью, циклоалкильные (алициклические) группы, замещенные алкилом циклоалкильные группы и замещенные циклоалкилом алкильные группы. В некоторых вариантах реализации изобретения алкил содержит 1-100 атомов углерода. В предпочтительных вариантах реализации изобретения алкил с линейной или разветвленной цепью содержит примерно 1-20 атомов углерода в основной цепи (*например*, C₁-C₂₀ для неразветвленной цепи, C₂-C₂₀ для разветвленной цепи), альтернативно, примерно 1-10. В некоторых вариантах реализации циклоалкильные кольца содержат примерно 3-10 атомов углерода в своей кольцевой структуре, причем такие кольца являются моноциклическими, бициклическими или полициклическими, альтернативно, примерно 5, 6 или 7 атомов углерода в кольцевой структуре. В некоторых вариантах реализации алкильная группа может быть низшей алкильной группой, причем низшая алкильная группа содержит 1-4 атома углерода (*например*, C₁-C₄ для низших алкилов с линейной цепью).

[53] *Алкилен*: Термин "алкилен" относится к двухвалентной алкильной группе.

[54] *Аминокислота*: При использовании в данном документе, в своем самом широком смысле, относится к любому соединению и/или веществу, которое может быть включено в полипептидную цепь, *например*, путем образования одной или нескольких пептидных связей. В некоторых вариантах реализации аминокислота содержит аминогруппу и группу карбоновой кислоты. В некоторых вариантах реализации аминокислота имеет структуру $\text{NH}(\text{R}^{\text{a1}})-\text{L}^{\text{a1}}-\text{C}(\text{R}^{\text{a2}})(\text{R}^{\text{a3}})-\text{L}^{\text{a2}}-\text{COOH}$, где каждая переменная независимо имеет значение, описанное в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации аминокислота имеет общую структуру $\text{NH}(\text{R}')-\text{C}(\text{R}')_2-\text{COOH}$, где каждый R' независимо имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, аминокислота имеет общую структуру $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{R}')_2-\text{COOH}$, где R' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота имеет общую структуру $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{H})(\text{R}')-\text{COOH}$, где R' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота представляет собой природную аминокислоту. В некоторых

вариантах реализации изобретения аминокислота является неприродной аминокислотой; в некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота представляет собой D-аминокислоту; в некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота представляет собой L-аминокислоту. "Стандартная аминокислота" относится к любой из двадцати стандартных L-аминокислот, которые обычно присутствуют в природных пептидах. "Нестандартная аминокислота" относится к любой аминокислоте, отличной от стандартных аминокислот, независимо от того, является ли она синтезированной или была получена из природного источника. В некоторых вариантах реализации аминокислота, включая карбокси- и/или аминоконцевую аминокислоту полипептида, может содержать структурную модификацию по сравнению с общей структурой, приведенной выше. Например, в некоторых вариантах реализации аминокислота может быть модифицирована путем метилирования, амидирования, ацетилирования, пегилирования, гликозилирования, фосфорилирования и/или замещения (*например*, аминогруппы, группы карбоновой кислоты, одного или нескольких протонов, одного или нескольких атомов водорода, и/или гидроксильной группы) по сравнению с общей структурой. В некоторых вариантах реализации такая модификация может, например, изменить период полувыведения из циркуляции полипептида, содержащего модифицированную аминокислоту, по сравнению с полипептидом, содержащим в остальном идентичную немодифицированную аминокислоту. В некоторых вариантах реализации такая модификация существенно не изменяет релевантную активность полипептида, содержащего модифицированную аминокислоту, по сравнению с полипептидом, содержащим в остальном идентичную немодифицированную аминокислоту. Как будет ясно из контекста, в некоторых вариантах реализации термин «аминокислота» может использоваться по отношению к свободной аминокислоте; в некоторых вариантах реализации он может использоваться для обозначения аминокислотного остатка полипептида.

[55] *Аналог:* Используемый в данном документе термин «аналог» относится к веществу, которое имеет один или несколько общих конкретных структурных признаков, элементов, компонентов или фрагментов с эталонным веществом. Как правило, «аналог» демонстрирует значительное структурное сходство с эталонным веществом, например, имеет общую структуру ядра или консенсусную структуру, но также отличается некоторыми отдельными деталями. В некоторых вариантах реализации аналог представляет собой вещество, которое может быть получено из эталонного вещества, *например*, путем химических манипуляций с эталонным веществом. В некоторых вариантах реализации аналог представляет собой вещество, которое может быть получено путем проведения процесса синтеза, по существу аналогичного (*например*, имеющего

множество общих стадий) с процессом, в результате которого получают эталонное вещество. В некоторых вариантах реализации аналог получают или он может быть получен путем проведения процесса синтеза, отличного от использованного для получения эталонного вещества.

[56] *Животное*: При использовании в данном документе, относится к любому представителю животного мира. В некоторых вариантах реализации изобретения, «животное» относится к людям любого пола и на любой стадии развития. В некоторых вариантах реализации изобретения термин «животное» относится к не являющимся человеком животным на любой стадии развития. В некоторых вариантах реализации, указанное не являющееся человеком животное представляет собой млекопитающее (*например*, грызуна, мышь, крысу, кролика, обезьяну, собаку, кошку, овцу, крупный рогатый скот, примата и/или свинью). В некоторых вариантах реализации изобретения животные включают, без ограничений, млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб, насекомых и/или червей. В некоторых вариантах реализации животное может представлять собой трансгенное животное, генетически модифицированное животное и/или клон.

[57] *Приблизительно*: В данном документе термины "приблизительно" или "около" применительно к одному или нескольким значениям, представляющим интерес, относятся к значению, схожему с указанным эталонным значением. В некоторых вариантах реализации термины "приблизительно" или "около" относятся к диапазону значений, попадающих в пределы 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любую сторону (больше или меньше) от указанного эталонного значения, если иное не указано или не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышает 100% от возможного значения).

[58] *Арил*: Термин «арил», используемый отдельно или как часть более крупного фрагмента, такого как «аралкил», «аралкокси», «арилоксиалкил» и т.д., относится к моноциклическим, бициклическим или полициклическим кольцевым системам, содержащим в общей сложности от пяти до тридцати членов кольца, при этом по меньшей мере одно кольцо в системе является ароматическим. В некоторых вариантах реализации арильная группа представляет собой моноциклическую, бициклическую или полициклическую кольцевую систему, содержащую в общей сложности от пяти до четырнадцати членов кольца, при этом по меньшей мере одно кольцо в системе является ароматическим, и каждое кольцо в системе содержит от 3 до 7 членов кольца. В некоторых вариантах реализации арильная группа представляет собой биарильную

группу. Термин «арил» может использоваться взаимозаменяемо с термином «арильное кольцо». В некоторых вариантах реализации данного изобретения «арил» относится к ароматической кольцевой системе, которая включает, без ограничений, фенил, бифенил, нафтил, бинафтил, антрацил и т.п., которые могут нести один или несколько заместителей. В некоторых вариантах реализации в объем термина «арил», как он используется в данном документе, также входит группа, в которой ароматическое кольцо конденсировано с одним или несколькими неароматическими кольцами, такими как инданил, фталимидил, нафтимидил, фенантридинил или тетрагидронафтил и т.п., где радикал или точка присоединения находится на арильном кольце.

[59] *Связанный с:* Два события или объекта «связаны» друг с другом в том смысле, как этот термин используется в данном документе, если наличие, уровень и/или форма одного из них коррелирует с наличием, уровнем и/или формой другого. Например, конкретный объект (например, нуклеиновая кислота (например, геномная ДНК, транскрипты, мРНК и т.п.), полипептид, «генетическая подпись», метаболит, микроорганизм и т.д.) считается связанным с конкретным заболеванием, расстройством или состоянием, если его наличие, уровень и/или форма коррелируют с частотой и/или восприимчивостью к заболеванию, расстройству или состоянию (например, в соответствующей популяции).

[60] *Носитель:* в используемом в данном документе значении относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или среде-носителю, с которыми вводят композицию. В некоторых типичных вариантах реализации носители могут включать стерильные жидкости, такие как, например, воду и масла, включая нефтяные масла, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как, например, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. В некоторых вариантах реализации носители представляют собой или включают один или несколько твердых компонентов.

[61] *Сопоставимый:* В используемом в данном документе значении, термин «сопоставимый» относится к двум или более агентам, объектам, ситуациям, наборам условий и т.д., которые могут не быть идентичными друг другу, но достаточно похожи для проведения сравнения между ними, так чтобы специалист в данной области техники понял, что на основе наблюдаемых различий или сходств могут быть разумно сделаны выводы. В некоторых вариантах реализации сопоставимые наборы условий, обстоятельства, индивидуумы или популяции характеризуются множеством по существу идентичных признаков и одним или небольшим количеством различающихся признаков.

Специалистам в данной области будет понятно, в контексте, какая степень идентичности требуется в любых данных обстоятельствах для двух или более таких агентов, объектов, ситуаций, наборов условий *и т.д.*, чтобы они считались сопоставимыми. Например, специалистам в данной области техники будет понятно, что совокупности обстоятельств, индивидуумы или популяции сопоставимы друг с другом, если они характеризуются количеством и типом по существу идентичных признаков, достаточным, чтобы сделать разумный вывод о том, что различия в полученных результатах или наблюдаемых явлениях при или для различных совокупностей обстоятельств, индивидуумов или популяций вызваны отличиями в таких признаках или указывают на них.

[62] *Композиция:* Специалистам в данной области техники будет понятно, что термин «композиция» может использоваться для обозначения дискретного физического объекта, который включает один или несколько указанных компонентов. В общем, если не указано иное, композиция может иметь любую форму - *например*, газообразную, гелевую, жидкую, твердую *и т.д.*

[63] *Содержащий:* Композиция или способ, описанные в данном документе как «содержащие» один или несколько названных элементов или стадий, являются неокончательными, что означает, что названные элементы или стадии являются существенными, но другие элементы или стадии могут быть добавлены в объем композиции или способа. Во избежание многословия укажем, что следует также понимать, что любая композиция или способ, описанные как «содержащие» (или которые «содержат») один или несколько названных элементов или стадий, также описывают соответствующую более ограниченную композицию или способ, «состоящие по существу из» (или которые «состоят по существу из») тех же названных элементов или стадий, что означает, что композиция или способ включает названные существенные элементы или стадии, а также могут включать дополнительные элементы или стадии, которые не влияют значительно на основную и новую характеристику (характеристики) композиции или способа. Также подразумевается, что любая композиция или способ, описанные в данном документе как «содержащие» или «состоящие по существу из» одного или нескольких названных элементов или стадий, также описывают соответствующую более ограниченную и законченную композицию или способ, «состоящие из» (или которые «состоят из») названных элементов или стадий, исключая любые другие неназванные элементы или стадии. В любой композиции или способе, раскрытых в данном документе, известные или раскрытые эквиваленты любого названного существенного элемента или стадии могут быть использованы взамен данного элемента или стадии.

[64] *Циклоалифатический:* Термин «циклоалифатический», используемый в

данном документе, относится к насыщенным или частично ненасыщенным алифатическим моноциклическим, бициклическим или полициклическим кольцевым системам, имеющим, *например*, от 3 до 30 членов, причем алифатическая кольцевая система необязательно является замещенной. Циклоалифатические группы включают, без ограничений, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил, циклогептенил, циклооктил, циклооктенил, норборнил, адамантил и циклооктадиенил. В некоторых вариантах реализации циклоалкил содержит 3-6 атомов углерода. Термин «циклоалифатический» может также включать алифатические кольца, которые конденсированы с одним или несколькими ароматическими или неароматическими кольцами, такими как декагидронафтил или тетрагидронафтил, где радикал или точка присоединения находится на алифатическом кольце. В некоторых вариантах реализации циклоалкильная группа является бициклической. В некоторых вариантах реализации циклоалкильная группа является трициклической. В некоторых вариантах реализации циклоалкильная группа является полициклической. В некоторых вариантах реализации «циклоалифатический» (или «карбоцикл», или «циклоалкил») относится к моноциклическому C₃-C₆ углеводороду или бициклическому углеводороду C₈-C₁₀, который является полностью насыщенным или который содержит одну или несколько единиц ненасыщенности, но не является ароматическим, или трициклическому углеводороду C₉-C₁₆, который является полностью насыщенным или который содержит одну или несколько единиц ненасыщенности, но не является ароматическим.

[65] *Производное*: Используемый в данном документе термин «производное» относится к структурному аналогу вещества сравнения. Таким образом, «производное» - это вещество, которое демонстрирует значительное структурное сходство с веществом сравнения, например, имеет общую структуру ядра или консенсусную структуру, но также отличается определенными отдельными деталями. В некоторых вариантах реализации производное представляет собой вещество, которое можно получить из вещества сравнения с помощью химических манипуляций. В некоторых вариантах реализации, производное представляет собой вещество, которое можно получить путем проведения процесса синтеза, по существу схожего (например, имеющего множество общих стадий) с процессом получения вещества сравнения.

[66] *Лекарственная форма или единичная лекарственная форма*: Специалистам в данной области техники будет понятно, что термин "лекарственная форма" может использоваться по отношению к физически дискретной единице активного агента

(например, терапевтического или диагностического агента) для введения субъекту. Обычно каждая такая единица содержит заранее определенное количество активного агента. В некоторых вариантах реализации такое количество представляет собой единичную дозу (или ее кратную часть), подходящую для введения в соответствии с режимом введения, который, как было установлено, коррелирует с желаемым или благоприятным результатом при введении соответствующей популяции (т.е. с терапевтическим режимом введения). Специалистам в данной области понятно, что общее количество терапевтической композиции или агента, вводимого конкретному субъекту, определяется одним или несколькими лечащими врачами и может включать введение многократных доз.

[67] *Режим введения:* Специалистам в данной области будет понятно, что термин «режим введения» может использоваться для обозначения набора стандартных доз (обычно более одной), которые индивидуально вводятся субъекту, обычно через промежутки времени. В некоторых вариантах реализации, некоторый данный терапевтический агент имеет рекомендованную схему введения, которая может включать одну или несколько доз. В некоторых вариантах реализации схема введения включает множество доз, отделенных во времени от других доз. В некоторых вариантах реализации индивидуальные дозы отделены друг от друга периодом времени одинаковой продолжительности; в некоторых вариантах реализации режим введения включает многократные дозы и по меньшей мере два разных периода времени, разделяющих отдельные дозы. В некоторых вариантах реализации все дозы в схеме введения имеют одинаковую величину стандартной дозы. В некоторых вариантах реализации разные дозы в схеме введения имеют различные величины. В некоторых вариантах реализации схема введения включает первую дозу, соответствующую первой величине дозы, за которой следуют одна или несколько дополнительных доз, соответствующих второй величине дозы, отличной от первой величины дозы. В некоторых вариантах реализации схема введения включает первую дозу, соответствующую первой величине дозы, за которой следуют одна или несколько дополнительных доз, соответствующих второй величине дозы, равной первой величине дозы. В некоторых вариантах реализации режим введения коррелирует с желаемым или благоприятным результатом при введении в соответствующей популяции (т.е. представляет собой терапевтический режим введения).

[68] *Галоген:* Термин «галоген» означает F, Cl, Br или I.

[69] *Гетероалифатический:* Термин «гетероалифатический» имеет обычное значение в данной области техники и относится к алифатическим группам, как описано в

данном документе, в которых один или несколько атомов углерода заменены одним или несколькими гетероатомами (*например*, кислородом, азотом, серой, кремнием, фосфором и т.п.).

[70] *Гетероалкил*: Термин «гетероалкил» имеет обычное значение в данной области техники и относится к алкильным группам, как описано в данном документе, в которых один или несколько атомов углерода заменены гетероатомом (*например*, кислородом, азотом, серой, кремнием, фосфором и т.п.). Примеры гетероалкильных групп включают, без ограничений, алкокси, поли(этиленгликоль)-, алкилзамещенные аминогруппы, тетрагидрофуранил, пиперидинил, морфолинил и т.д.

[71] *Гетероарил*: Термины «гетероарил» и «гетероар-», используемые по отдельности или как часть более крупного фрагмента, *например*, «гетероаралкил» или «гетероаралкокси», относятся к моноциклическим, бициклическим или полициклическим кольцевым системам, имеющим, например, в общей сложности от пяти до тридцати, *например*, 5, 6, 9, 10, 14 и т.д., членов кольца, причем по меньшей мере одно кольцо в системе является ароматическим и по меньшей мере один атом ароматического кольца является гетероатомом. В некоторых вариантах реализации гетероатом представляет собой азот, кислород или серу. В некоторых вариантах реализации гетероарильная группа представляет собой группу, содержащую от 5 до 10 кольцевых атомов (*т.е.*, моноциклическую, бициклическую или полициклическую), в некоторых вариантах реализации - 5, 6, 9 или 10 кольцевых атомов. В некоторых вариантах реализации гетероарильная группа имеет 6, 10 или 14 обобществленных π -электронов в циклической системе; и содержит, помимо атомов углерода, от одного до пяти гетероатомов. Гетероарильные группы включают, без ограничения, тиенил, фуранил, пирролил, имидазолил, пиразолил, триазолил, тетразолил, оксазолил, изоксазолил, оксадиазолил, тиазолил, изотиазолил, тиадиазолил, пиридил, пиридазинил, пиримидинил, пиразинил, индолизинил, пуринил, нафтиридинил и птеридинил. В некоторых вариантах реализации гетероарил представляет собой гетеробиарильную группу, такую как бипиридил и т.п. Термины «гетероарил» и «гетероар-», используемые в данном документе, также включают группы, в которых гетероароматическое кольцо сконденсировано с одним или несколькими арильными, циклоалифатическими или гетероциклическими кольцами. Неограничительные примеры включают индолил, изоиндолил, бензотиенил, бензофуранил, дибензофуранил, индазолил, бензимидазолил, бензтиазолил, хинолил, изохинолил, циннолинил, фталазинил, хиназолинил, хиноксалинил, 4*H*-хинолизинил, карбазолил, акридинил, феназинил, фенотиазинил, феноксазинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил и пиридо[2,3-*b*]-1,4-оксазин-3(4*H*)-он. Гетероарильная группа

может быть моноциклической, бициклической или полициклической. Термин «гетероарил» может использоваться взаимозаменяемо с терминами «гетероарильное кольцо», «гетероарильная группа» или «гетероароматический», любой из которых включает кольца, являющиеся необязательно замещенными. Термин «гетероаралкил» относится к алкильной группе, замещенной гетероарильной группой, причем алкильный и гетероарильный фрагменты независимо являются необязательно замещенными.

[72] *Гетероатом*: Термин «гетероатом» означает атом, который не является углеродом и водородом. В некоторых вариантах реализации гетероатом представляет собой кислород, серу, азот, фосфор, бор или кремний (включая любую окисленную форму азота, серы, фосфора или кремния; кватернизированную форму любого основного азота или замещаемого азота гетероциклического кольца, (например, N, как в 3,4-дигидро-2H-пирролиле), NH (как в пирролидиниле) или NR^+ (как в N-замещенном пирролидиниле) и т.д.). В некоторых вариантах реализации гетероатом представляет собой бор, азот, кислород, кремний, серу или фосфор. В некоторых вариантах реализации, гетероатом представляет собой азот, кислород, кремний, серу или фосфор. В некоторых вариантах реализации, гетероатом представляет собой азот, кислород, серу или фосфор. В некоторых вариантах реализации гетероатом представляет собой азот, кислород или серу.

[73] *Гетероцикл*: Используемые в данном документе термины «гетероцикл», «гетероцикл

ил», «гетероциклический радикал» и «гетероциклическое кольцо» используются взаимозаменяемо и относятся к моноциклическому, бициклическому или полициклическому кольцевому фрагменту (например, 3-30-членному), который является насыщенным либо частично ненасыщенным и содержит один или несколько кольцевых гетероатомов. В некоторых вариантах реализации гетероатом представляет собой бор, азот, кислород, кремний, серу или фосфор. В некоторых вариантах реализации, гетероатом представляет собой азот, кислород, кремний, серу или фосфор. В некоторых вариантах реализации, гетероатом представляет собой азот, кислород, серу или фосфор. В некоторых вариантах реализации гетероатом представляет собой азот, кислород или серу. В некоторых вариантах реализации гетероциклическая группа представляет собой стабильное 5-7-членный моноциклический или 7–10-членный бициклический гетероциклический фрагмент, который является насыщенным либо частично ненасыщенным, и содержит, в дополнение к углеродным атомам, один или несколько, предпочтительно, от одного до четырех, гетероатомов, как определено выше. При использовании по отношению к кольцевому атому гетероцикла, термин "азот" включает замещенный атом азота. В качестве примера, в насыщенном или частично ненасыщенном кольце, имеющем 0-3 гетероатома, выбранных из кислорода, серы или азота, азот может

представлять собой N (как в 3,4-дигидро-2*H*-пирролиле), NH (как в пирролидиниле), или ^+NR (как в *N*-замещенном пирролидиниле). Гетероциклическое кольцо может быть связано со своей боковой группой через любой гетероатом или атом углерода, которые дают стабильную структуру, и любой из атомов кольца может быть необязательно замещен. Примеры таких насыщенных или частично ненасыщенных гетероциклических радикалов включают, без ограничений, тетрагидрофуранил, тетрагидротиенил, пирролидинил, пиперидинил, пирролинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, оксазолидинил, пиперазинил, диоксанил, диоксоланил, диазепинил, оксазепинил, тиазепинил, морфолинил и хинуклидинил. Термины «гетероцикл», «гетероциклил», «гетероциклическое кольцо», «гетероциклическая группа», «гетероциклический фрагмент» и «гетероциклический радикал» используются в данном документе взаимозаменяемо и также включают группы, в которых гетероциклическое кольцо конденсировано с одним или несколькими арильными, гетероарильными или циклоалифатическими кольцами, такими как индолинил, 3*H*-индолил, хроманил, фенантридинил или тетрагидрохинолинил, причем радикал или точка присоединения находится на гетероалифатическом кольце. Гетероциклическая группа может быть моноциклической, бициклической или полициклической. Термин «гетероциклилалкил» относится к алкильной группе, замещенной гетероциклилом, причем алкильный и гетероциклический фрагменты независимо необязательно являются замещенными.

[74] *Гомология:* В данном документе термин "гомология" относится к общему родству между полимерными молекулами, *например*, между молекулами нуклеиновых кислот (*например*, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. В некоторых вариантах реализации полимерные молекулы считаются «гомологичными» друг другу, если их последовательности идентичны на по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%. В некоторых вариантах реализации полимерные молекулы считаются «гомологичными» друг другу, если их последовательности схожи на по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% (*например*, содержат остатки с аналогичными химическими свойствами в соответствующих положениях). Например, как хорошо известно специалистам в данной области техники, определенные аминокислоты обычно классифицируются по сходству друг с другом как «гидрофобные» или «гидрофильные» аминокислоты, и/или как имеющие «полярные» или «неполярные» боковые цепи. Замена одной аминокислоты на другую того же типа часто может считаться «гомологичной» заменой. Типичные

категории аминокислот приведены ниже:

Аланин	Ala	A	неполярная	нейтральная	1,8
Аргинин	Arg	R	полярная	положительно заряженная	-4,5
Аспарагин	Asn	N	полярная	нейтральная	-3,5
Аспарагиновая кислота	Asp	D	полярная	отрицательно заряженная	-3,5
Цистеин	Cys	C	неполярная	нейтральная	2,5
Глутаминовая кислота	Glu	E	полярная	отрицательно заряженная	-3,5
Глутамин	Gln	Q	полярная	нейтральная	-3,5
Глицин	Gly	G	неполярная	нейтральная	-0,4
Гистидин	His	H	полярная	положительно заряженная	-3,2
Изолейцин	Ile	I	неполярная	нейтральная	4,5
Лейцин	Leu	L	неполярная	нейтральная	3,8
Лизин	Lys	K	полярная	положительно заряженная	-3,9
Метионин	Met	M	неполярная	нейтральная	1,9
Фенилаланин	Phe	F	неполярная	нейтральная	2,8
Пролин	Pro	P	неполярная	нейтральная	-1,6
Серин	Ser	S	полярная	нейтральная	-0,8
Треонин	Thr	T	полярная	нейтральная	-0,7
Триптофан	Trp	W	неполярная	нейтральная	-0,9
Тирозин	Tyr	Y	полярная	нейтральная	-1,3
Валин	Val	V	неполярная	нейтральная	4,2

Неоднозначные аминокислоты	3-буквенный код	1-буквенный код
Аспарагин или аспарагиновая кислота	Asx	B
Глутамин или глутаминовая кислота	Glx	Z
Лейцин или изолейцин	Xle	J
Неуказанная или неизвестная аминокислота	Xaa	X

[75] Как будет понятно специалистам в данной области, доступны различные алгоритмы, которые позволяют сравнивать последовательности для определения степени их гомологии, в том числе путем разрешения пропусков заданной длины в одной последовательности относительно другой при определении того, какие остатки «соответствуют» друг другу в разных последовательностях. Расчет процента гомологии двух последовательностей нуклеиновых кислот может производиться, например, путем выравнивания двух последовательностей с целью оптимального сравнения (например, для оптимального сравнения пропуски могут быть введены в одну или обе из первой и второй последовательностей нуклеиновых кислот, а несоответствующими последовательностями для целей сравнения можно пренебречь). В некоторых вариантах реализации длина последовательности, выравниваемой с целью сравнения, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, или по существу 100% длины эталонной последовательности. Затем сравниваются нуклеотиды в соответствующих нуклеотидных положениях. Когда некоторое положение в первой последовательности занято тем же нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, указанные молекулы являются идентичными в данном положении; когда положение в первой последовательности занято нуклеотидом, подобным находящемуся в соответствующем положении во второй последовательности, молекулы являются подобными в данном положении. Процент гомологии между двумя последовательностями является функцией числа идентичных и подобных положений, общих для указанных последовательностей, с учетом количества пропусков и длины каждого пропуска, который должен быть введен для оптимального выравнивания двух последовательностей. Иллюстративные алгоритмы и компьютерные программы, полезные для определения процента гомологии между двумя нуклеотидными последовательностями, включают, например, алгоритм Мейерса и Миллера (Meyers and Miller) (CABIOS, 1989, 4:11-17), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с применением таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за удлинение гэпа 12 и штрафа за открытие гэпа 4. Альтернативно, процент гомологии между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен, например, с применением программы GAP из пакета программного обеспечения GCG с применением матрицы NWSgapdna.CMP.

[76] «Улучшенный», «увеличенный» или «уменьшенный»: При использовании в данном документе эти или грамматически сопоставимые сравнительные термины указывают на значения, сравниваемые с сопоставимыми эталонными измерениями.

Например, в некоторых вариантах реализации оцениваемое значение, полученное для агента, представляющего интерес, может быть «улучшенным» по сравнению со значением, полученным с применением сопоставимого эталонного агента. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах реализации, оцениваемое значение, достигнутое для субъекта или системы, представляющих интерес, может быть «улучшенным» по сравнению с полученным для тех же субъекта или системы в других условиях (*например*, до или после какого-либо события, такого как введение агента, представляющего интерес), или для другого сопоставимого субъекта (*например*, для сопоставимых субъекта или системы, которые отличаются от субъекта или системы, представляющих интерес, в присутствии одного или нескольких индикаторов определенного заболевания, расстройства или состояния, представляющих интерес, или при предшествующем воздействии состояния или агента, *и т.д.*). В некоторых вариантах реализации, сравнительные термины относятся к статистически значимым различиям (*например*, имеющим частоту и/или величину, достаточную для достижения статистической значимости). Специалисты в данной области техники должны знать или могут легко определить в заданном контексте степень и/или частоту различий, необходимые или достаточные для достижения такой статистической значимости.

[77] *Частично ненасыщенный*: При использовании в данном документе, термин «частично ненасыщенный» относится к фрагменту, который включает по меньшей мере одну двойную или тройную связь. Термин «частично ненасыщенный» должен охватывать группы, имеющие множество сайтов ненасыщенности, но не включает арильные или гетероарильные фрагменты.

[78] *Пептид*: Термин «пептид», при использовании в данном документе, относится к полипептиду, который обычно является относительно коротким, например, имеет длину менее примерно 100 аминокислот, менее примерно 50 аминокислот, менее примерно 40 аминокислот, менее примерно 30 аминокислот, менее примерно 25 аминокислот, менее примерно 20 аминокислот, менее примерно 15 аминокислот или менее примерно 10 аминокислот.

[79] *Фармацевтическая композиция*: Используемый в данном документе термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции активного агента, составленной с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах реализации активный агент присутствует в количестве стандартной дозы, подходящем для введения в схеме лечения, которое демонстрирует статистически значимую вероятность достижения заданного терапевтического эффекта при введении в

соответствующей популяции. В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции могут быть специально составлены для введения в твердой или жидкой форме, включая предназначенные для следующего: пероральное введение, например, лекарственные формы для введения больших доз (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, *например*, предназначенные для буккального, сублингвального и системного всасывания, болусы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; парентеральное введение, например, путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции в виде, например, стерильного раствора или суспензии, или состава с замедленным высвобождением; местное применение, например, в виде крема, мази или пластыря с контролируемым высвобождением или спрея, наносимых на кожу, вводимых в легкие или полость рта; интравагинально или интаректально, например, в виде pessaria, крема или пены; сублингвально; окулярно; трансдермально; или назально, легочно и на другие поверхности слизистой оболочки.

[80] *Фармацевтически приемлемый:* При использовании в данном документе, фраза «фармацевтически приемлемый» относится к соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые с медицинской точки зрения, являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соразмерно разумному соотношению польза/риск.

[81] *Фармацевтически приемлемый носитель:* При использовании в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или среду-носитель, такие как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент или материал для капсулирования растворителя, используемые для переноса или транспортировки соединения по изобретению из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами композиции и не наносить вреда пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошок трагакантовой камеди; солод; желатин; тальк; эксципиенты, такие как масло какао и воска для суппозитория; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин,

сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический раствор хлорида натрия; раствор Рингера; этиловый спирт; забуференные растворы; полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

[82] *Фармацевтически приемлемая соль*: При использовании в данном документе, термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к солям, которые, с медицинской точки зрения, пригодны для применения в контакте с тканями людей и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.п., соразмерно с разумным соотношением польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны. Например, S.M. Berge с соавторами подробно описывает фармацевтически приемлемые соли в публикации J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977). В некоторых вариантах реализации, фармацевтически приемлемые соли включают, без ограничений, нетоксичные соли присоединения кислот, которые представляют собой соли аминокислот, образованные с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или полученные путем применения других известных способов, таких как ионный обмен. В некоторых вариантах реализации, фармацевтически приемлемые соли включают, без ограничений, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидройодид, 2-оксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, *n*-толуолсульфонат, ундеканат, валератные соли и т.п. В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемые соли включают, без ограничений, нетоксичные соли присоединения оснований, такие как образуемые кислотными группами предоставленных соединений (*например*, группы фосфатных связей олигонуклеотидов, группы фосфоротиоатных связей олигонуклеотидов и т.д.) с основаниями. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и т.п.

В некоторых вариантах реализации, фармацевтически приемлемые соли представляют собой аммониевые соли (*например*, $-N(R)_3^+$). В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемые соли представляют собой соли натрия. В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемые соли включают, когда это уместно, нетоксичный аммоний, четвертичный аммоний, и катионы амина, образованные с применением противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, алкил, содержащий от 1 до 6 атомов углерода, сульфонат и арилсульфонат.

[83] *Полипептид*: При использовании в данном документе, относится к любой полимерной цепи аминокислот. В некоторых вариантах реализации полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая встречается в природе. В некоторых вариантах реализации, полипептид имеет аминокислотную последовательность, не встречающуюся в природе. В некоторых вариантах реализации полипептид имеет сконструированную аминокислотную последовательность, так чтобы она была разработана и/или получена человеком искусственно. В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать или состоять из природных аминокислот, неприродных аминокислот, или обоих. В некоторых вариантах реализации, полипептид может содержать или состоять только из природных аминокислот или только из неприродных аминокислот. В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать D-аминокислоты, L-аминокислоты или оба вида. В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать только D-аминокислоты. В некоторых вариантах реализации, полипептид может содержать только L-аминокислоты. В некоторых вариантах реализации полипептид может включать одну или несколько боковых групп или другие модификации, *например*, модифицирующие или присоединенные к одной или нескольким боковым цепям аминокислот, на N-конце полипептида, на C-конце полипептида, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах реализации такие боковые группы или модификации могут быть выбраны из группы, состоящей из ацетилирования, амидирования, липидизации, метилирования, пегилирования *и т.д.*, включая их комбинации. В некоторых вариантах реализации полипептид может быть циклическим, и/или может содержать циклическую часть. В некоторых вариантах реализации полипептид не является циклическим и/или не содержит циклической части. В некоторых вариантах реализации полипептид является линейным. В некоторых вариантах реализации полипептид может представлять собой или содержать сшитый полипептид. В некоторых вариантах реализации термин «полипептид» может быть добавлен к названию эталонного полипептида, активности или структуры; в таких случаях

он используется в данном документе для обозначения полипептидов, которые обладают общей соответствующей активностью или структурой и, таким образом, могут рассматриваться как члены одного класса или семейства полипептидов. Для каждого такого класса данное описание предусматривает, и/или специалистам в данной области будут известны типичные для данного класса полипептиды, аминокислотные последовательности и/или функции которых являются известными; в некоторых вариантах реализации такие типичные полипептиды являются эталонными полипептидами для класса или семейства полипептидов. В некоторых вариантах реализации член класса или семейства полипептидов демонстрирует значительную гомологию или идентичность последовательности, имеет общий мотив последовательности (*например*, характеристический элемент последовательности), и/или обладает общей активностью (в некоторых вариантах реализации - на сравнимом уровне или в заданном диапазоне) с эталонным полипептидом этого класса; в некоторых вариантах реализации - со всеми полипептидами внутри класса). Например, в некоторых вариантах реализации представитель полипептида демонстрирует общую степень гомологии или идентичности последовательности с эталонным полипептидом, которая составляет по меньшей мере примерно 30-40%, и часто более примерно 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, и/или включает по меньшей мере одну область (*например*, консервативную область, которая в некоторых вариантах реализации может представлять собой или содержать характеристический элемент последовательности), которая демонстрирует очень высокую идентичность последовательности, часто более 90%, или даже 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Такая консервативная область обычно охватывает по меньшей мере 3-4, а часто до 20 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации консервативная область охватывает по меньшей мере один участок, состоящий из по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более смежных аминокислот. В некоторых вариантах реализации соответствующий полипептид может содержать или состоять из фрагмента исходного полипептида. В некоторых вариантах реализации пригодный полипептид, который может содержать или состоять из множества фрагментов, каждый из которых присутствует в одном и том же исходном полипептиде с пространственным расположением друг относительно друга, отличным от имеющегося в интересующем полипептиде (*например*, фрагменты, которые в родительском элементе непосредственно связаны, в представляющем интерес полипептиде могут быть пространственно разделены, или наоборот, и/или фрагменты в представляющем интерес полипептиде могут присутствовать в другом порядке, чем в исходном), так что представляющий интерес

полипептид является производным от своего исходного полипептида.

[84] *Предотвращать* или *профилактика*: в данном документе, при использовании в связи с возникновением заболевания, расстройства и/или состояния, относится к снижению риска развития заболевания, расстройства и/или состояния, и/или к задержке появления одной или нескольких характеристик или симптомов заболевания, расстройства или состояния. Профилактика может считаться полной, если начало заболевания, расстройства или состояния было задержано на предварительно определенный период времени.

[85] *Защитная группа*: Фраза «защитная группа», используемая в данном документе, относится к временным заместителям, которые защищают потенциально реакционноспособную функциональную группу от нежелательных химических превращений. Примеры таких защитных групп включают сложные эфиры карбоновых кислот, силиловые эфиры спиртов, а также ацетали и кетали альдегидов и кетонов, соответственно. «Защитная группа Si» представляет собой защитную группу, содержащую атом Si, такую как Si-триалкил (*например*, триметилсилил, трибутилсилил, трет-бутилдиметилсилил), Si-триарил, Si-алкилдифенил (*например*, трет-бутилдифенилсилил) или Si-арилдиалкил (*например*, Si-фенилдиалкил). Обычно защитная группа Si присоединена к атому кислорода. Обзор химии защитных групп представлен в Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd ed.; Wiley: New York, 1991. Такие защитные группы (и связанные с ними защищенные фрагменты) более подробно описаны ниже.

[86] Защищенные гидроксильные группы хорошо известны в данной области и включают группы, подробно описанные в *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Примеры соответствующим образом защищенных гидроксильных групп включают, без ограничений, сложные эфиры, карбонаты, сульфонаты, аллиловые эфиры, простые эфиры, силиловые эфиры, простые алкиловые эфиры, арилалкиловые эфиры и алкоксиалкиловые эфиры. Примеры подходящих сложных эфиров включают формиаты, ацетаты, пропионаты, пентаноаты, кротонаты и бензоаты. Конкретные примеры подходящих сложных эфиров включают формиат, бензоилформиат, хлорацетат, трифторацетат, метоксиацетат, трифенилметоксиацетат, п-хлорфеноксиацетат, 3-фенилпропионат, 4-оксопентаноат, 4,4-(этилендитио)пентаноат, пивалоат (триметилацетат), кротонат, 4-метоксикротонат, бензоат, п-бензилбензоат, 2,4,6-триметилбензоат. Примеры подходящих карбонатов включают 9-флуоренилметил, этил, 2,2,2-трихлорэтил, 2-(триметилсилил)этил, 2-

(фенилсульфонил)этил, винил, аллил и п-нитробензилкарбонат. Примеры подходящих силиловых эфиров включают триметилсилил, триэтилсилил, трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилдифенилсилил, триизопропилсилиловый эфир и другие триалкилсилиловые эфиры. Примеры подходящих простых алкиловых эфиров включают метиловый, бензиловый, п-метоксибензиловый, 3,4-диметоксибензиловый, тритиловый, трет-бутиловый и аллиловый эфир или их производные. Алкоксиалкиловые эфиры включают ацетали, такие как метоксиметил, метилтиометил, (2-метоксиэтокси)метил, бензилоксиметил, бета-(триметилсилил)этоксиметил и тетрагидропиран-2-иловый простой эфир. Примеры подходящих арилалкиловых эфиров включают бензил, п-метоксибензил (МРМ), 3,4-диметоксибензил, О-нитробензил, п-нитробензил, п-галогенбензил, 2,6-дихлорбензил, п-цианобензил, 2- и 4-пиколиловые простые эфиры.

[87] Защищенные амины хорошо известны в данной области техники и включают те, которые были подробно описаны в Greene (1999). Подходящие монозащищенные амины дополнительно включают, без ограничений, аралкиламины, карбаматы, аллиламины, амиды и т.п. Примеры подходящих монозащищенных фрагментов аминогрупп включают трет-бутилоксикарбониламино (-NHBOC), этилоксикарбониламино, метилоксикарбониламино, трихлорэтилоксикарбониламино, аллилоксикарбониламино (-NHAlloc), бензилоксикарбониламино (-NHCBZ), аллиламино, бензиламино (-NH_{Bn}), флуоренилметилкарбонил (-NH_{Fmoc}), формамидо, ацетамидо, хлорацетамидо, дихлорацетамидо, трихлорацетамидо, фенилацетамидо, трифторацетамидо, бензамидо, трет-бутилдифенилсилил и т.п. Подходящие дизащищенные амины включают амины, которые замещены двумя заместителями, независимо выбранными из описанных выше как монозащищенные амины, и дополнительно включают циклические имиды, такие как фталимид, малеимид, сукцинимид и т.п. Подходящие дизащищенные амины также включают пирролы и т.п., 2,2,5,5-тетраметил-[1,2,5]азадисилолидин и т.п., и азид.

[88] Защищенные альдегиды хорошо известны в данной области техники и включают описанные подробно в Greene (1999). Подходящие защищенные альдегиды дополнительно включают, без ограничений, ациклические ацетали, циклические ацетали, гидразоны, имины и т.п. Примеры таких групп включают диметилацеталь, диэтилацеталь, диизопропилацеталь, дибензилацеталь, бис(2-нитробензил)ацеталь, 1,3-диоксаны, 1,3-диоксоланы, семикарбазоны и их производные.

[89] Защищенные карбоновые кислоты хорошо известны в данной области техники и включают описанные подробно в Greene (1999). Подходящие защищенные карбоновые кислоты дополнительно включают, без ограничений, необязательно

замещенные C₁₋₆ алифатические сложные эфиры, необязательно замещенные ариловые сложные эфиры, силиловые сложные эфиры, активированные сложные эфиры, амиды, гидразиды и т.п. Примеры таких сложноэфирных групп включают метиловый, этиловый, пропиловый, изопропиловый, бутиловый, изобутиловый, бензиловый и фениловый сложный эфир, причем каждая группа необязательно является замещенной. Дополнительные подходящие защищенные карбоновые кислоты включают оксазолины и сложные ортоэфиры.

[90] Защищенные тиолы хорошо известны в данной области техники и включают описанные подробно в Greene (1999). Подходящие защищенные тиолы дополнительно включают, без ограничений, дисульфиды, простые тиоэфиры, простые силитиоэфиры, сложные тиоэфиры, тиокарбонаты, тиокарбаматы и т.п. Примеры таких групп включают, в качестве нескольких примеров, без ограничений, простые алкилтиоэфиры, простые бензил- и замещенные бензилтиоэфиры, простые трифенилметилтиоэфиры и сложный трихлорэтоксикарбонилтиоэфир.

[91] *Эталон:* В данном документе термин “эталон” описывает стандарт или контроль, по отношению к которому выполняют сравнение. Например, в некоторых вариантах реализации агент, животное, индивида, популяцию, образец, последовательность или значение, представляющие интерес, сравнивают с эталонным или контрольным агентом, животным, индивидом, популяцией, образцом, последовательностью или значением. В некоторых вариантах реализации тестирование и/или определение эталона или контроля проводят по существу одновременно с тестированием или определением, представляющим интерес. В некоторых вариантах реализации эталон или контроль являются историческим эталоном или контролем, необязательно воплощенным в материальном носителе. Обычно, как будет понятно специалистам в данной области техники, эталон или контроль определяют или характеризуют в условиях или обстоятельствах, сопоставимых с теми, для которых проводится оценка. Специалисты в данной области техники должны понимать, когда имеющееся сходство является достаточным для обоснования надежности применения конкретного возможного эталона или контроля и/или возможности сравнения с ним.

[92] *Замещение:* Как описано в данном документе, соединения по данному изобретению могут содержать необязательно замещенные и/или замещенные фрагменты. В общем, термин «замещенный», с используемым перед ним термином «необязательно» или без него, означает, что один или несколько атомов водорода указанного фрагмента замещены подходящим заместителем. Если не указано иное, то «необязательно замещенная» группа может иметь подходящий заместитель в каждом замещаемом

положении указанной группы, и если в любой данной структуре более одного положения может быть замещено более, чем одним заместителем, выбранным из определенной группы, то такие заместители в каждом положении могут быть одинаковыми или различными. Комбинации заместителей, предусматриваемых данным изобретением, предпочтительно являются такими, которые приводят к образованию стабильных или химически возможных соединений. Термин «стабильный», при использовании в данном документе, относится к соединениям, которые существенно не изменяются при воздействии условий, обеспечивающих возможность их получения, обнаружения и, в некоторых вариантах реализации, их выделения, очистки и применения для одной или нескольких целей, раскрытых в данном документе. Для некоторых вариантов реализации примеры заместителей описаны ниже.

[93] Подходящие одновалентные заместители представляют собой галоген; $-(CH_2)_{0-4}R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OR^\circ$; $-O(CH_2)_{0-4}R^\circ$; $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}CH(OR^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}Ph$, который может быть замещен R° ; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$, который может быть замещен R° ; $-CH=CHPh$, который может быть замещен R° ; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$ -пиридил, который может быть замещен R° ; $-NO_2$; $-CN$; $-N_3$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)N(R^\circ)_2$; $-N(R^\circ)C(S)N(R^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)N(R^\circ)_2$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)R^\circ$; $-C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OSi(R^\circ)_3$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R^\circ$; $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR^\circ$; $-SC(S)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)N(R^\circ)_2$; $-C(S)N(R^\circ)_2$; $-C(S)SR^\circ$; $-SC(S)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)N(R^\circ)_2$; $-C(O)N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(O)C(O)R^\circ$; $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$; $-C(NOR^\circ)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SSR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^\circ$; $-S(O)_2N(R^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)S(O)_2N(R^\circ)_2$; $-N(R^\circ)S(O)_2R^\circ$; $-N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(NH)N(R^\circ)_2$; $-Si(R^\circ)_3$; $-OSi(R^\circ)_3$; $-P(R^\circ)_2$; $-P(OR^\circ)_2$; $-OP(R^\circ)_2$; $-OP(OR^\circ)_2$; $-N(R^\circ)P(R^\circ)_2$; $-B(R^\circ)_2$; $-OB(R^\circ)_2$; $-P(O)(R^\circ)_2$; $-OP(O)(R^\circ)_2$; $-N(R^\circ)P(O)(R^\circ)_2$; $-(C_{1-4}$ прямой или разветвленный алкилен) $O-N(R^\circ)_2$; или $-(C_{1-4}$ прямой или разветвленный алкилен) $C(O)O-N(R^\circ)_2$, где каждый R° может быть замещен, как описано ниже, и независимо представляет собой водород, C_{1-20} -алифатическую группу, C_{1-20} -гетероалифатическую группу, имеющую 1-5 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, серы, кремния и фосфора, $-CH_2-(C_{6-14}$ арил), $-O(CH_2)_{0-1}(C_{6-14}$ арил), $-CH_2-(5-14\text{-членное гетероарильное кольцо})$, $5-20\text{-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, имеющее 0-5 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, серы, кремния и фосфора, или, несмотря на приведенное выше определение, два независимых}$

R° , взятые вместе с промежуточным атомом (атомами) между ними, образуют 5-20-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, имеющее 0–5 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, серы, кремния и фосфора, которые могут быть замещены, как описано ниже.

[94] Подходящие одновалентные заместители у R° (или у кольца, образованного двумя независимыми R° вместе с промежуточными атомами между ними) независимо представляют собой галоген, $-(CH_2)_{0-2}R^\bullet$, $-(haloR^\bullet)$, $-(CH_2)_{0-2}OH$, $-(CH_2)_{0-2}OR^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}CH(OR^\bullet)_2$, $-O(haloR^\bullet)$, $-CN$, $-N_3$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)R^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)OH$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)OR^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}SR^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}SH$, $-(CH_2)_{0-2}NH_2$, $-(CH_2)_{0-2}NHR^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}NR^\bullet_2$, $-NO_2$, $-SiR^\bullet_3$, $-OSiR^\bullet_3$, $-C(O)SR^\bullet$, $-(C_{1-4} \text{ линейный или разветвленный алкилен})-C(O)OR^\bullet$, или $-SSR^\bullet$, где каждый $R^\bullet$ является незамещенным, или, при использовании перед ним термина «галоид», является замещенным только одним или несколькими галогенами, и независимо выбирают из C_{1-4} -алифатической группы, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, или 5–6-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, имеющее 0–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы. Подходящие двухвалентные заместители у насыщенного атома углерода R° включают $=O$ и $=S$.

[95] Подходящие двухвалентные заместители представляют собой следующие: $=O$, $=S$, $=NNR^\bullet_2$, $=NNHC(O)R^\bullet$, $=NNHC(O)OR^\bullet$, $=NNHS(O)_2R^\bullet$, $=NR^\bullet$, $=NOR^\bullet$, $-O(C(R^\bullet_2))_{2-3}O-$, или $-S(C(R^\bullet_2))_{2-3}S-$, где в каждом независимом случае $R^\bullet$ выбирают из водорода, C_{1-6} -алифатической группы, которая может быть замещена, как описано ниже, или незамещенное 5–6-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, имеющее 0–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы. Подходящие двухвалентные заместители, которые связаны с вицинальными замещаемыми атомами углерода «необязательно замещенной» группы, включают: $-O(CR^\bullet_2)_{2-3}O-$, где в каждом независимом случае $R^\bullet$ выбирают из водорода, C_{1-6} -алифатической группы, которая может быть замещена, как описано ниже, или незамещенное 5–6-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, имеющее 0–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы.

[96] Подходящие заместители у алифатической группы $R^\bullet$ представляют собой галоген, $-R^\bullet$, $-(\text{галоид}-R^\bullet)$, $-OH$, $-OR^\bullet$, $-O(\text{галоид}-R^\bullet)$, $-CN$, $-C(O)OH$, $-C(O)OR^\bullet$, $-NH_2$, $-NHR^\bullet$, $-NR^\bullet_2$, или $-NO_2$, где каждый $R^\bullet$ является незамещенным или, в случае применения с предшествующим термином «галоид», является замещенным только одним или несколькими галогенами, и независимо представляет собой C_{1-4} -алифатическую группу, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, или 5–6-членное насыщенное, частично ненасыщенное

или арильное кольцо, имеющее 0–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы.

[97] В некоторых вариантах реализации, подходящие заместители у замещаемого атома азота представляют собой $-R^{\dagger}$, $-NR^{\dagger}_2$, $-C(O)R^{\dagger}$, $-C(O)OR^{\dagger}$, $-C(O)C(O)R^{\dagger}$, $-C(O)CH_2C(O)R^{\dagger}$, $-S(O)_2R^{\dagger}$, $-S(O)_2NR^{\dagger}_2$, $-C(S)NR^{\dagger}_2$, $-C(NH)NR^{\dagger}_2$ или $-N(R^{\dagger})S(O)_2R^{\dagger}$; где каждый $R^{\dagger}$ независимо представляет собой водород, C_{1-6} алифатическую группу, которая может быть замещена, как описано ниже, незамещенный $-OPh$ или незамещенное 5–6–членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, имеющее 0–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, или, несмотря на приведенное выше определения, два независимых $R^{\dagger}$, взятые вместе с промежуточным атомом (атомами) между ними, образуют незамещенное 3–12–членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное моно- или бициклическое кольцо, имеющее 0–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы.

[98] Подходящие заместители на алифатической группе $R^{\bullet}$ независимо представляют собой галоген, $-R^{\bullet}$, $-(\text{галоид}-R^{\bullet})$, $-OH$, $-OR^{\bullet}$, $-O-(\text{галоид}-R^{\bullet})$, $-CN$, $-C(O)OH$, $-C(O)OR^{\bullet}$, $-NH_2$, $-NHR^{\bullet}$, $-NR^{\bullet}_2$ или $-NO_2$, где каждый $R^{\bullet}$ является незамещенным или, в случае применения с предшествующим термином «галоид», является замещенным только одним или несколькими галогенами, и независимо представляет собой C_{1-4} алифатическую группу, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_0-1Ph$, или 5–6–членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, имеющее 0–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы.

[99] *Субъект*: При использовании в данном документе, термин "субъект" или "испытуемый субъект" относится к любому организму, в который вводится предлагаемое соединение или композиция в соответствии с данным изобретением, *например*, в экспериментальных, диагностических, профилактических или терапевтических целях. Типичные субъекты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, нечеловекообразные приматы и люди; насекомые; черви и т.д.) и растения. В некоторых вариантах реализации субъект может страдать от и/или быть восприимчивым к заболеванию, расстройству и/или состоянию. В некоторых вариантах реализации субъект представляет собой человека.

[100] *Восприимчивый к*: Индивидуум, являющийся «восприимчивым к» заболеванию, расстройству и/или состоянию, имеет повышенный риск развития заболевания, расстройства и/или состояния по сравнению с обычным членом общества. В некоторых вариантах реализации индивидуум, восприимчивый к заболеванию,

расстройству и/или состоянию, может не иметь диагностированного заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах реализации индивидуум, восприимчивый к заболеванию, расстройству и/или состоянию, может демонстрировать симптомы болезни, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах реализации, индивидуум, восприимчивый к заболеванию, расстройству и/или состоянию, может не демонстрировать симптомы болезни, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах реализации у индивидуума, восприимчивого к заболеванию, расстройству и/или состоянию, будет развиваться заболевание, расстройство и/или состояние. В некоторых вариантах реализации у индивидуума, восприимчивого к заболеванию, расстройству и/или состоянию, не будет развиваться заболевание, расстройство и/или состояние.

[101] *Терапевтический агент:* При использовании в данном документе фраза «терапевтический агент» относится к агенту, который при введении субъекту оказывает терапевтический эффект и/или вызывает желаемый биологический и/или фармакологический эффект. В некоторых вариантах реализации терапевтический агент представляет собой любое вещество, которое может быть использовано для смягчения, улучшения, облегчения, подавления, предотвращения, отсрочки появления, снижения тяжести и/или снижения частоты одного или нескольких симптомов или признаков заболевания, расстройства и/или состояния.

[102] *Схема лечения:* «Схема лечения», как этот термин используется в данном документе, относится к режиму введения доз, осуществление которого в соответствующей популяции может коррелировать с желаемым или благоприятным терапевтическим результатом.

[103] *Терапевтически эффективное количество:* Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» означает количество вещества (*например*, терапевтического агента, композиции и/или состава), которое вызывает желаемый биологический ответ при введении в рамках схемы лечения. В некоторых вариантах реализации терапевтически эффективное количество вещества представляет собой количество, которое является достаточным, при введении субъекту, страдающему от или восприимчивому к заболеванию, расстройству и/или состоянию, для лечения, диагностики, профилактики и/или задержки начала заболевания, расстройства и/или состояния. Как будет понятно специалистам в данной области техники, эффективное количество вещества может варьироваться в зависимости от таких факторов, как желаемая биологическая конечная точка, доставляемое вещество, клетки- или ткани-мишени, *и т.д.* Например, эффективное количество соединения в составе для лечения

заболевания, расстройства и/или состояния - это количество, которое смягчает, улучшает, облегчает, подавляет, предотвращает, отсрочивает начало, снижает тяжесть и/или снижает частоту одного или нескольких симптомов или признаков заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах реализации терапевтически эффективное количество вводится в разовой дозе; в некоторых вариантах реализации требуются многократные дозы для доставки терапевтически эффективного количества.

[104] *Лечить*: При использовании в данном документе, термин «лечить», «лечение» или «процесс лечения» относится к любому способу, применяемому для частичного или полного облегчения, улучшения, ослабления, ингибирования, предотвращения, задержки развития, уменьшения тяжести и/или уменьшения частоты одного или нескольких симптомов или признаков заболевания, расстройства и/или состояния. Лечение может проводиться для субъекта, который не проявляет признаков заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах реализации лечение может проводиться для субъекта, который демонстрирует только ранние признаки заболевания, например, с целью снижения риска развития патологии, связанной с заболеванием, расстройством и/или состоянием.

[105] *Стандартная доза*: Выражение «стандартная доза», используемое в данном документе, относится к количеству, вводимому в виде разовой дозы, и/или в физически дискретной единице фармацевтической композиции. Во многих вариантах реализации стандартная доза содержит заранее определенное количество активного агента. В некоторых вариантах реализации стандартная доза содержит полную разовую дозу агента. В некоторых вариантах реализации вводят более одной стандартной дозы для достижения полной разовой дозы. В некоторых вариантах реализации многократные дозы являются требуемыми, или считаются требуемыми для достижения желаемого эффекта. Стандартная доза может представлять собой, *например*, некоторый объем жидкости (например, приемлемого носителя), содержащий предварительно определенное количество одного или нескольких терапевтических агентов, предварительно определенное количество одного или нескольких терапевтических агентов в твердой форме, композицию с замедленным высвобождением или устройство доставки лекарственного средства, содержащие предварительно определенное количество одного или нескольких терапевтических агентов *и т.д.* Следует понимать, что стандартная доза может присутствовать в композиции, которая включает любые из множества компонентов дополнительно к терапевтическому агенту (агентам). Например, могут быть включены приемлемые носители (*например*, фармацевтически приемлемые носители), разбавители, стабилизаторы, буферы, консерванты *и т.д.*, как описано ниже. Специалистам в данной

области будет понятно, что во многих вариантах реализации полная надлежащая суточная доза конкретного терапевтического агента может включать какую-то часть или множество стандартных доз и может быть определена, например, лечащим врачом как обоснованное врачебное решение. В некоторых вариантах реализации, конкретный уровень эффективной дозы для любого конкретного субъекта или организма может зависеть от множества факторов, включая расстройство, подлежащее лечению, и тяжесть расстройства; активность конкретного применяемого активного агента; конкретную применяемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион субъекта; время введения и скорость экскреции конкретного применяемого активного соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства и/или дополнительные способы лечения, используемые в комбинации или совместно с конкретным используемым соединением (соединениями), и аналогичные факторы, хорошо известные в области медицины.

[106] *Ненасыщенный*: Используемый в данном документе термин «ненасыщенный» означает, что фрагмент имеет одну или несколько единиц ненасыщенности.

[107] *Дикого типа*: Используемый в данном документе термин «дикого типа» имеет понятное в данной области техники значение, которое относится к объекту, имеющему структуру и/или активность, которые наблюдаются в природе в «нормальном» (в отличие от мутантного, больного, измененного *и т.д.*) состоянии или контексте. Специалисту в данной области техники будет понятно, что гены и полипептиды дикого типа часто существуют в большом количестве разных форм (*например*, аллелей).

[108] Если не указано иное, включены соли, такие как фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот или оснований, стереоизомерные формы и таутомерные формы предлагаемого соединения.

[109] Если иное не следует из контекста, в данном изобретении: (i) форма единственного числа может пониматься как означающая «по меньшей мере один»; (ii) термин «или» может пониматься как означающий «и/или»; (iii) термины «содержащий» и «включающий» могут пониматься как охватывающие детализированные компоненты или стадии, независимо от того, представлены они сами по себе или вместе с одним или несколькими дополнительными компонентами или стадиями; и (iv) термины «примерно» и «приблизительно» могут пониматься как допускающие стандартные отклонения, как будет понятно специалистам в данной области техники; и (v) в случае указания диапазонов, они включают конечные точки.

Пептидные агенты

[110] Технологии, предусматриваемые и/или описанные в данном изобретении, относятся, в частности, к пептидным агентам, например, к агентам, которые представляют собой или содержат сшитые пептиды.

[111] Помимо прочего, данное изобретение предусматривает технологии для разработки, идентификации, характеристики и/или изготовления сшитых пептидов, которые могут модулировать одну или несколько функций мишени, представляющей интерес. В некоторых вариантах реализации сшитые пептиды полезны для лечения различных состояний, расстройств и/или заболеваний, связанных с мишенью, представляющей интерес. В данном документе описаны типичные структурные элементы предлагаемых сшитых пептидов.

[112] Помимо прочего, как обсуждается в данном документе, данное изобретение включает понимание того, что биологические системы можно применять для получения пептидных агентов, которые включают остатки цистеина, подходящие для и/или поддающиеся сшиванию цистеином. В данном изобретении дополнительно предусматривается, что применение таких биологических систем может обеспечить высокопроизводительное производство и/или оценку сшитых цистеином пептидов (например, в отношении одной или нескольких (например, специфичности, аффинности, скорости ассоциации, скорости диссоциации, устойчивости к конкуренции, кривой связывания в диапазоне условий, таких как концентрация, температура, pH, осмоляльность, присутствие или количество конкурента и т.д.) характеристик их связывающих взаимодействий с одной или несколькими мишенями, представляющими интерес.

[113] Таким образом, в некоторых вариантах реализации, данное изобретение предусматривает пептидные агенты, которые включают два или более остатков цистеина, расположенных на соответствующем расстоянии друг от друга, чтобы поддерживать сшивание цистеином. В некоторых вариантах реализации предусматриваются коллекции таких пептидных агентов. В некоторых вариантах реализации предусматриваются сшитые цистеином пептиды и/или их коллекции.

[114] В данном изобретении также предусматривается, что идеи, почерпнутые из производства, скрининга и/или иного анализа или характеристики одного или нескольких сшитых цистеином пептидов, могут послужить обоснованием в разработке, производстве и/или применении аналогичных или сопоставимых (например, содержащих те же самые или практически такие же [например, за исключением одной или нескольких консервативных замен и/или одного или небольшого количества других изменений] аминокислотные последовательности, за исключением замены того остатка (остатков)

цистеина, который участвует в сшивании, на нецистеиновый остаток (остатки), который может или участвует в аналогичном или сопоставимом сшивании) пептидных агентов, которые имеют общую со своим «родительским» сшитым цистеином пептидом одну или несколько характеристик связывания с конкретной мишенью, представляющей интерес. Данное изобретение, таким образом, предусматривает пептидные агенты (например, представляющие собой или содержащие сшитые пептиды), которые соответствуют сшитым с помощью цистеина пептидам (но включают нецистеиновый остаток (остатки), а не цистеины, участвующие в сшивании).

Аминокислотная последовательность

[115] Одним из особых преимуществ технологий, предоставляемых данным изобретением, является то, что они позволяют обнаруживать и/или определять аминокислотные последовательности, которые особенно пригодны для сшитых пептидов (например, которые связываются с конкретной представляющей интерес мишенью).

[116] Таким образом, в некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает аминокислотные последовательности для сшитых пептидов. В некоторых вариантах реализации сшитые пептиды, содержащие предложенные аминокислотные последовательности, взаимодействуют (например, напрямую связываются) с представляющей интерес мишенью, и в некоторых вариантах реализации такое связывание демонстрирует одну или несколько характеристик, описанных в данном документе.

[117] Как будет понятно специалистам в этой области, читающим данное описание, в некоторых вариантах реализации данное изобретение определяет полезные аминокислотные последовательности из коллекции, которая может быть очень разнообразной - например, может включать две или более аминокислотных альтернатив в любом из или в коллекции (включая все) положений аминокислотной цепи, за исключением участвующих в сшивке, которые, во многих вариантах реализации, являются цистеинами.

[118] В некоторых вариантах реализации аминокислотные последовательности, используемые в пептидных агентах, как описано в данном документе, могут представлять собой, или содержать, или происходить из последовательности, которая встречается в природе или в другом подходящем эталонном полипептиде (например, о котором может быть известно, что он связывается с релевантной представляющей интерес мишенью, например, посредством взаимодействия, характеризующегося одной или несколькими признаками, описанными в данном документе).

[119] В некоторых вариантах реализации аминокислотная последовательность, которая используется в пептидном агенте или в коллекции пептидных агентов, как описано в данном документе, является вариантом эталонной последовательности в том смысле, что (1) она включает пару остатков цистеина, по меньшей мере один из которых не находится в соответствующем положении в эталонной последовательности, и которые могут быть подвергнуты или участвуют в цистеиновом сшивании; и/или (2) она включает аминокислотную замену в одном или нескольких положениях эталонной последовательности. В некоторых вариантах реализации замена может быть консервативной заменой, как это понимается в данной области техники. В некоторых вариантах реализации замена может включать замену гомолога. В некоторых вариантах реализации гомолог аминокислоты представляет собой природную или не встречающуюся в природе аминокислоту, которая имеет одно или несколько свойств, схожих с заменяемой аминокислотой и/или боковыми цепями аминокислоты, например, которые обычно классифицируются по сходству друг с другом как «неполярные», «полярные», «гидрофобные», «гидрофильные», «основные», «кислые», «алифатические», «ароматические» и/или «близкие по размеру».

[120] Например, в некоторых вариантах реализации, в зависимости от контекста, гомолог лейцина может быть необязательно замещенной аминокислотой, выбранной из изолейцина, аланина, гомолейцина, 3-циклобутилаланина, альфа-неопентилглицина, 3-циклопропилаланина, альфа-метиллейцина и 3-циклогексилаланина; гомолог изолейцина может быть необязательно замещенной аминокислотой, выбранной из аланина, лейцина, гомолейцина, 3-циклобутилаланина, альфа-неопентилглицина, 3-циклопропилаланина, L-аллоизолейцина и альфа-метиллейцина; гомолог фенилаланина может быть необязательно замещенным аминокислотным остатком, выбранным из триптофана, тирозина, 3-(1-нафтилаланина), 3-(2-нафтилаланина), 2-хлорфенилаланина, 3-хлорфенилаланина, 4-хлорфенилаланина, 4-трет-бутилфенилаланина, O-метилтирозина, гомофенилаланина, 4-фторфенилаланина, 4-метилфенилаланина, 4-бромфенилаланина, 4-фенил-L-фенилаланина, 5-хлортриптофана, 5-гидрокситриптофана, 4-трифторметилфенилаланина, 4-гуанидино-L-фенилаланина, 2-хиноил-L-аланина, 3-циклобутилаланина, альфа-неопентилглицина и L-2-аминоадипиновой кислоты; *и т.д.*

[121] В некоторых вариантах реализации гомолог неполярной аминокислоты представляет собой другую неполярную аминокислоту. В некоторых вариантах реализации гомолог аминокислоты, содержащей неполярную боковую цепь, представляет собой другую неполярную аминокислоту, содержащую неполярную боковую цепь.

[122] В некоторых вариантах реализации, гомолог полярной аминокислоты

представляет собой другую полярную аминокислоту. В некоторых вариантах реализации, гомолог аминокислоты, содержащей полярную боковую цепь, представляет собой другую полярную аминокислоту, содержащую полярную боковую цепь.

[123] В некоторых вариантах реализации гомолог гидрофобной аминокислоты представляет собой другую гидрофобную аминокислоту. В некоторых вариантах реализации гомолог аминокислоты, содержащей гидрофобную боковую цепь, представляет собой другую гидрофобную аминокислоту, содержащую гидрофобную боковую цепь.

[124] В некоторых вариантах реализации, гомолог гидрофильной аминокислоты представляет собой другую гидрофильную аминокислоту. В некоторых вариантах реализации, гомолог аминокислоты, содержащей гидрофильную боковую цепь, представляет собой другую гидрофильную аминокислоту, содержащую гидрофильную боковую цепь.

[125] В некоторых вариантах реализации гомолог основной аминокислоты представляет собой другую основную аминокислоту. В некоторых вариантах реализации гомолог аминокислоты, содержащей основную боковую цепь, представляет собой другую основную аминокислоту, содержащую основную боковую цепь.

[126] В некоторых вариантах реализации, гомолог кислой аминокислоты представляет собой другую кислую аминокислоту. В некоторых вариантах реализации, гомолог аминокислоты, содержащей кислотную боковую цепь представляет собой другую кислую аминокислоту, содержащую кислотную боковую цепь.

[127] В некоторых вариантах реализации, гомолог алифатической аминокислоты представляет собой другую алифатическую аминокислоту. В некоторых вариантах реализации, гомолог аминокислоты, содержащей алифатическую боковую цепь, представляет собой другую алифатическую аминокислоту, содержащую алифатическую боковую цепь.

[128] В некоторых вариантах реализации, гомолог ароматической аминокислоты представляет собой другую ароматическую аминокислоту. В некоторых вариантах реализации, гомолог аминокислоты, содержащей ароматическую боковую цепь, представляет собой другую ароматическую аминокислоту, содержащую ароматическую боковую цепь.

[129] В некоторых вариантах реализации гомолог аминокислоты стерически подобен указанной аминокислоте. В некоторых вариантах реализации гомолог аминокислоты содержит боковую цепь, размер которой близок к боковой цепи указанной аминокислоты.

[130] Предложенные аминокислотные последовательности и сшитые пептиды могут иметь различную длину, например, 2-100, 5-50, 5-40, 5-35, в диапазоне от 2, 3, 4, 5, 6 или 7 включительно до 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 аминокислотных остатков включительно.

[illegible]

некоторых вариантах реализации длина составляет по меньшей мере 31 аминокислотный остаток. В некоторых вариантах реализации длина составляет по меньшей мере 32 аминокислотных остатка. В некоторых вариантах реализации длина составляет по меньшей мере 33 аминокислотных остатка. В некоторых вариантах реализации длина составляет по меньшей мере 34 аминокислотных остатка. В некоторых вариантах реализации длина составляет по меньшей мере 35 аминокислотных остатков.

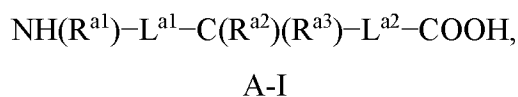
[illegible]

остатка. В некоторых вариантах реализации длина составляет 34 аминокислотных остатка. В некоторых вариантах реализации длина составляет 35 аминокислотных остатков.

[133] В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 17 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 18 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 19 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 20 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 21 аминокислотного остатка. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 22 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 23 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 24 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 25 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 26 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 27 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 28 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 29 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 30 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 35 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 40 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет не более 50 аминокислотных остатков.

[134] В соответствии с данным изобретением могут применяться как природные, так и не природные аминокислоты. В некоторых вариантах реализации аминокислота представляет собой соединение, содержащее аминогруппу, которая может образовывать амидную группу с карбоксильной группой, и карбоксильную группу.

[135] В некоторых вариантах реализации аминокислота представляет собой соединение, имеющее структуру формулы A-I:



или ее соль, где:

каждый из R^{a1} , R^{a2} , R^{a3} независимо представляет собой $-\text{L}^{\text{a}}-\text{R}'$;

каждый из L^{a} , L^{a1} и L^{a2} независимо представляет собой L ;

каждый L независимо представляет собой ковалентную связь, или необязательно замещенную двухвалентную $\text{C}_1\text{-C}_{25}$ алифатическую группу, причем одно или несколько

метиленовых звеньев алифатической группы обязательно и независимо замещены на $-\text{C}(\text{R}')_2-$, $-\text{Cy}-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{S})-$, $-\text{C}(\text{NR}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ или $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$;

каждый $-\text{Cy}-$ независимо представляет собой обязательно замещенную двухвалентную группу, выбранную из C_{3-20} циклоалифатического кольца, C_{6-20} арильного кольца, 5-20-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3-20-членного гетероциклического кольца, содержащего 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния;

каждый R' независимо представляет собой $-\text{R}$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}$, $-\text{CO}_2\text{R}$ или $-\text{SO}_2\text{R}$;

каждый R независимо представляет собой $-\text{H}$ или обязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-30} алифатической, C_{1-30} гетероалифатической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, C_{6-30} арильной, C_{6-30} арилалифатической, C_{6-30} арилгетероалифатической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, 5-30-членной гетероарильной, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3-30-членной гетероциклической группы, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, или

две группы R , обязательно и независимо, вместе образуют ковалентную связь, или:

две или более групп R на одном и том же атоме, обязательно и независимо, вместе с указанным атомом образуют обязательно замещенное 3-30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее, помимо указанного атома, 0-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния; или две или более групп R на двух или нескольких атомах, обязательно и независимо, вместе с промежуточными атомами между ними, образуют обязательно замещенное 3-30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее, в дополнение к промежуточным атомам, 0-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния.

[136] В некоторых вариантах реализации L^{a1} представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах реализации соединение формулы А-1 имеет структуру $\text{NH}(\text{R}^{\text{a1}})-\text{C}(\text{R}^{\text{a2}})(\text{R}^{\text{a3}})-\text{L}^{\text{a2}}-\text{COOH}$.

[137] В некоторых вариантах реализации, L^{a2} представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах реализации, соединение формулы А-1 имеет структуру



[138] В некоторых вариантах реализации L^{a1} представляет собой ковалентную связь, и L^{a2} представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах реализации, соединение формулы А-1 имеет структуру $\text{NH}(\text{R}^{\text{a1}})-\text{C}(\text{R}^{\text{a2}})(\text{R}^{\text{a3}})-\text{COOH}$.

[139] В некоторых вариантах реализации, L^{a} представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах реализации, R' представляет собой R . В некоторых вариантах реализации, R^{a1} представляет собой R , где R имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, R^{a2} представляет собой R , где R имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, R^{a3} представляет собой R , где R имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации каждый из R^{a1} , R^{a2} и R^{a3} независимо представляет собой R , где R имеет значения, описанные в данном изобретении.

[140] В некоторых вариантах реализации R^{a1} представляет собой водород. В некоторых вариантах реализации, R^{a2} представляет собой водород. В некоторых вариантах реализации, R^{a3} представляет собой водород. В некоторых вариантах реализации R^{a1} представляет собой водород, и по меньшей мере один из R^{a2} и R^{a3} представляет собой водород. В некоторых вариантах реализации R^{a1} представляет собой водород, один из R^{a2} и R^{a3} представляет собой водород, а другой не является водородом.

[141] В некоторых вариантах реализации, R^{a2} представляет собой $-\text{L}^{\text{a}}-\text{R}$, где R имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации R^{a2} представляет собой $-\text{L}^{\text{a}}-\text{R}$, где R представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{3-30} циклоалифатической, C_{5-30} арильной, 5-30-членной гетероарильной, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, сера, фосфор и кремний, и 3-30-членной гетероциклической группы, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах реализации R^{a2} представляет собой $-\text{L}^{\text{a}}-\text{R}$, где R представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{6-30} арила и 5-30-членного гетероарила, содержащего 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах реализации R^{a2} представляет собой боковую цепь аминокислоты. В некоторых вариантах реализации, R^{a2} представляет собой боковую цепь стандартной аминокислоты.

[142] В некоторых вариантах реализации, R^{a3} представляет собой $-\text{L}^{\text{a}}-\text{R}$, где R имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, R^{a3} представляет собой $-\text{L}^{\text{a}}-\text{R}$, где R представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{3-30} циклоалифатической, C_{5-30} арильной, 5-30-членной

гетероарильной, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3-30-членной гетероциклической группы, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах реализации, R^{a3} представляет собой $-L^a-R$, где R представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{6-30} арила и 5-30-членного гетероарила, содержащего 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах реализации, R^{a3} представляет собой боковую цепь аминокислоты. В некоторых вариантах реализации, R^{a3} представляет собой боковую цепь стандартной аминокислоты.

[143] Аминокислотная последовательность может иметь различную степень гомологии с природными аминокислотными последовательностями. Как понятно специалистам в этой области техники, данное изобретение можно применять для конструирования и идентификации последовательностей с высокой или низкой гомологией или без гомологии (например, последовательностей, совершенно не связанных с какими-либо последовательностями, кодируемыми в геноме). В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает технологии для идентификации полезных аминокислотных последовательностей, которые имеют общую низкую степень гомологии с встречающимися в природе аминокислотными последовательностями, например, из библиотек, разработанных со многими случайными положениями по сравнению с естественными аминокислотными последовательностями, или из полностью случайных библиотек. В некоторых вариантах реализации аминокислотная последовательность по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% гомологична природной аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах реализации, аминокислотную последовательность гомологична природной аминокислотной последовательности не более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%. В некоторых вариантах реализации гомология составляет по меньшей мере 5%. В некоторых вариантах реализации, гомология составляет по меньшей мере 10%. В некоторых вариантах реализации, гомология составляет по меньшей мере 20%. В некоторых вариантах реализации, гомология составляет по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах реализации, гомология составляет по меньшей мере 40%. В некоторых вариантах реализации, гомология составляет по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах реализации, гомология составляет по меньшей мере 60%. В некоторых вариантах реализации, гомология составляет по меньшей мере 70%. В некоторых вариантах реализации, гомология составляет по меньшей мере 80%. В некоторых вариантах

или включает по меньшей мере 18 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет или включает по меньшей мере 20 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет или включает по меньшей мере 25 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации длина составляет или включает по меньшей мере 30 аминокислотных остатков.

[145] Как показано в данном документе, предложенные технологии можно применять с применением исходной аминокислотной последовательности или без нее (например, либо полностью случайные библиотеки, либо библиотеки, содержащие некоторые заранее определенные аминокислотные остатки в определенных положениях) для идентификации полезных аминокислотных последовательностей с желаемыми свойствами и/или активностями. В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает полезные аминокислотные последовательности для модуляции мишеней, например, белков, связанных с различными состояниями, расстройствами или заболеваниями. В некоторых вариантах реализации предложенная аминокислотная последовательность включает $X_{s1}X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_{s2}$, где X_{s1} и X_{s2} представляют собой аминокислотные остатки, соединенные посредством сшивки, и каждый из X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 и X_6 независимо представляет собой аминокислотный остаток. В некоторых вариантах реализации X_3 и X_4 представляют собой А, и X_5 представляет собой Н. В некоторых вариантах реализации X_2 представляет собой L, X_3 и X_4 представляют собой А, и X_5 представляет собой Н. В некоторых вариантах реализации X_2 представляет собой L. В некоторых вариантах реализации X_1 представляет собой I. В некоторых вариантах реализации предложенная аминокислотная последовательность включает $X_{s1}X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_{s2}X_7X_8$, где X_{s1} и X_{s2} представляют собой аминокислотные остатки, соединенные посредством сшивки, и каждый из X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 и X_8 независимо представляет собой аминокислотный остаток. В некоторых вариантах реализации X_3 и X_4 представляют собой А, и X_6 представляет собой Н. В некоторых вариантах реализации X_2 представляет собой остаток ароматической аминокислоты, X_3 и X_4 представляют собой А, и X_6 представляет собой Н. В некоторых вариантах реализации X_2 представляет собой W. В некоторых вариантах реализации X_1 представляет собой Е. В некоторых вариантах реализации X_7 представляет собой кислый аминокислотный остаток. В некоторых вариантах реализации X_7 представляет собой Е. В некоторых вариантах реализации X_8 представляет собой L. В некоторых вариантах реализации предложенная аминокислотная последовательность включает $X_{-2}X_{-1}X_{s1}X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_{s2}X_7$, где X_{s1} и X_{s2} представляют собой аминокислотные остатки, соединенные посредством сшивки, и каждый из X_{-2} , X_{-1} , X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 и X_7 независимо представляет собой аминокислотный остаток. В

некоторых вариантах реализации X_2 представляет собой H, X_3 представляет собой A, и X_4 представляет собой A. В некоторых вариантах реализации X_{-2} представляет собой W. В некоторых вариантах реализации X_{-1} представляет собой кислый аминокислотный остаток. В некоторых вариантах реализации X_{-1} представляет собой E. В некоторых вариантах реализации X_{-1} представляет собой D. В некоторых вариантах реализации X_1 представляет собой кислый аминокислотный остаток. В некоторых вариантах реализации X_1 представляет собой E. В некоторых вариантах реализации X_1 представляет собой D. В некоторых вариантах реализации X_5 представляет собой L или I. В некоторых вариантах реализации X_5 представляет собой L. В некоторых вариантах реализации X_5 представляет собой I. В некоторых вариантах реализации X_6 представляет собой L или I. В некоторых вариантах реализации X_6 представляет собой L. В некоторых вариантах реализации X_6 представляет собой I. В некоторых вариантах реализации X_7 представляет собой кислый аминокислотный остаток. В некоторых вариантах реализации X_7 представляет собой E. В некоторых вариантах реализации X_7 представляет собой D.

Библиотеки пептидов

[146] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает коллекцию пептидов. В некоторых вариантах реализации коллекция пептидов представляет собой коллекцию сшитых пептидов. В некоторых вариантах реализации пептиды в коллекции, как описано в данном документе, могут иметь один или несколько общих структурных признаков (например, длину в определенном диапазоне; наличие определенных элементов последовательности, таких как, например, элемент последовательности, обнаруженный у известного партнера по взаимодействию для мишени, представляющей интерес, или набор аминокислот, которые вместе поддерживают формирование сшивки [например, два или более остатков цистеина, расположенных друг относительно друга таким образом, чтобы между ними образовывалась или могла образовываться цистеиновая сшивка, как описано в данном документе], наличие одной или нескольких сшивок, которые в некоторых вариантах реализации могут быть одного типа и т.д., или любую их комбинацию, и в некоторых вариантах реализации конкретная коллекция может быть охарактеризована и/или определена с помощью такого общего структурного признака (признаков)). В некоторых вариантах реализации, общим структурным признаком пептидов в коллекции пептидов, как описано в данном документе, являются по меньшей мере два остатка цистеина, расположенные по отношению друг к другу таким образом, чтобы цистеиновая сшивка, как описано в данном документе, была или могла быть образована между такой парой; в

некоторых вариантах реализации, такие пептиды могут реагировать с соединением формулы R-I, с образованием коллекции сшитых пептидов.

[147] В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов представляет собой коллекцию сшитых пептидов, каждый из которых независимо имеет аминокислотную последовательность, которая:

имеет длину в диапазоне от a^* до b^* , где a^* и b^* обозначают каждое целое число, независимо выбранное из 2-100, и b^* больше a^* ; и

включает по меньшей мере одну пару остатков, ковалентно связанных друг с другом через линкер.

[148] В некоторых вариантах реализации a^* и b^* обозначают каждое целое число, независимо выбранное из 2-50, и b^* больше, чем a^* . В некоторых вариантах реализации, a^* и b^* обозначают каждое целое число, независимо выбранное из 6-36, и b^* больше a^* .

[149] В некоторых вариантах реализации, a^* равно 1. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 2. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 3. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 4. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 5. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 6. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 7. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 8. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 9. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 10. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 11. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 12. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 13. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 14. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 15. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 16. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 17. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 18. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 19. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 20. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 21. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 22. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 23. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 24. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 25. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 26. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 27. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 28. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 29. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 30. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 31. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 32. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 33. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 34. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 35. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 36. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 37. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 38. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 39. В некоторых вариантах реализации, a^* равно 40. В

с другом через линкер, ковалентно связана посредством сшивки. В некоторых вариантах реализации, пара остатков, ковалентно связанных друг с другом через линкер, ковалентно связана посредством неуглеводородной сшивки. В некоторых вариантах реализации, пара остатков, ковалентно связанных друг с другом через линкер, ковалентно связана с помощью цистеиновой сшивки. В некоторых вариантах реализации цистеиновая сшивка имеет структуру, описанную в данном изобретении.

[152] В некоторых вариантах реализации данного изобретения предлагается коллекция сшитых пептидов, каждый из которых независимо имеет аминокислотную последовательность, которая:

имеет длину в диапазоне от a^* до b^* , где a^* и b^* представляют собой целые числа, выбранные из 2-100 включительно, и b^* больше a^* ;

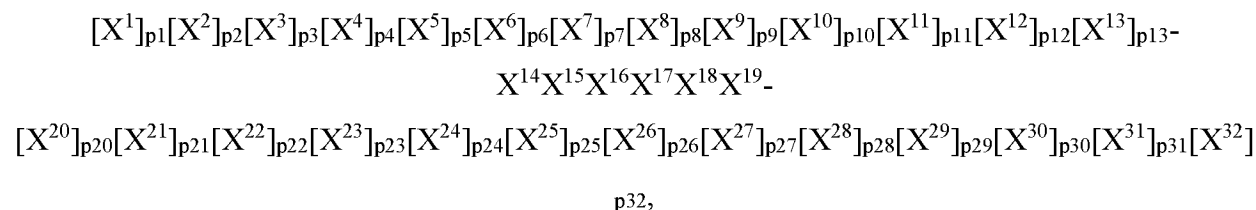
включает по меньшей мере одну пару остатков цистеина, ковалентно связанных друг с другом через линкер, содержащий фрагмент $-S-L^{s2}-S-$, где каждый S независимо представляет собой атом серы остатка цистеина;

L^{s2} описан в данном изобретении; и

остатки цистеина в паре независимо разделены c^* остатками, где c^* представляет собой целое число, выбранное из 0-12.

[153] В некоторых вариантах реализации пара остатков цистеина, ковалентно связанных друг с другом посредством линкера, разделены c^* остатками, при этом c^* представляет собой целое число, выбранное из 1-12 включительно. В некоторых вариантах реализации, c^* равно 1. В некоторых вариантах реализации, c^* равно 2. В некоторых вариантах реализации, c^* равно 3. В некоторых вариантах реализации, c^* равно 4. В некоторых вариантах реализации, c^* равно 5. В некоторых вариантах реализации, c^* равно 6. В некоторых вариантах реализации, c^* равно 7. В некоторых вариантах реализации, c^* равно 8. В некоторых вариантах реализации, c^* равно 9. В некоторых вариантах реализации, c^* равно 10. В некоторых вариантах реализации, c^* равно 11. В некоторых вариантах реализации, c^* равно 12.

[154] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает коллекцию сшитых пептидов структуры:



где:

каждый из $p1, p2, p3, p4, p5, p6, p7, p8, p9, p10, p11, p12, p13, p20, p21, p22, p23, p24, p25,$

$p_{26}, p_{27}, p_{28}, p_{29}, p_{30}, p_{31}, p_{32}$ независимо равен 0 или 1;

каждый из X^1-X^{32} независимо представляет собой аминокислотный остаток;

по меньшей мере, два из X^1-X^{32} содержат цистеиновые цепи, которые необязательно связаны вместе с образованием цистеиновой сшивки.

[155] В некоторых вариантах реализации каждый X^j независимо выбирают из группы стандартных аминокислот, где j обозначает целое число от 1 до 32 включительно. В некоторых вариантах реализации X^j выбирают из подмножества стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации X^j выбирают из группы всех природных аминокислот, кроме цистеина. В некоторых вариантах реализации X^j выбирают из менее чем 20 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 19 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 18 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 17 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 16 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 15 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 14 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 13 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 12 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 11 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 10 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 9 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 8 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 7 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 6 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 5 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 4 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j выбирают из менее чем 3 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации.

[156] В некоторых вариантах реализации каждый X^j независимо выбирают из 20 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j независимо выбирают из 19 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j независимо выбирают из 18 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j независимо выбирают из 17 стандартных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, X^j независимо выбирают из 16 стандартных аминокислот. В некоторых

[illegible][illegible]

[158] Специалистам в данной области, читающим данное изобретение, будет понятно, что коллекции пептидов, описанные в данном документе, могут быть получены, предоставлены и/или применены в различных форматах. В некоторых вариантах реализации коллекцию пептидов готовят, предоставляют и/или используют в таком формате, как, например, фаговый дисплей, дрожжевой дисплей, бактериальный дисплей, рибосомный дисплей, дисплей мРНК, на твердой подложке, на твердой фазе, на смоле, в жидком растворе, в виде высушенного образца, или их набора и т.д.

[159] В некоторых вариантах реализации коллекция пептидов может быть предоставлена и/или применена в фаговом дисплее. В некоторых вариантах реализации коллекция пептидов слита с фаговым белком. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов слита с белком фаговой оболочки. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов не слита с белком фаговой оболочки рIII.

[160] Коллекции пептидов могут быть отображены с применением ряда технологий. В некоторых вариантах реализации, пептиды библиотек отображаются на р4 фага М13. В некоторых вариантах реализации, пептиды библиотек отображаются на р7 фага М13. В некоторых вариантах реализации, пептиды библиотек отображаются на р8 фага М13. В некоторых вариантах реализации, пептиды библиотек отображаются на р9 фага М13.

[161] В некоторых вариантах реализации библиотеки, например, библиотеки фагов, могут быть получены с одним или несколькими штрих-кодами в последовательности ДНК членов библиотеки, например, содержащими «молчащие» мутации (например, отдельные кодоны, которые все кодируют одну и ту же аминокислоту), аминокислотные мутации и т.д. В некоторых вариантах реализации штрих-коды используются для идентификации определенных признаков членов библиотеки и/или определенных особенностей применения, например, экспериментов, в которых они подвергаются скринингу, так чтобы эти признаки могли быть соотнесены с результатами скрининга членов библиотеки, например, во время анализа результатов секвенирования ДНК при скринингах. Например, в некоторых вариантах реализации штрих-коды включены во множество библиотек, чтобы скрининг этих библиотек можно было проводить вместе, а их результаты идентифицировать (и разделять) с помощью штрих-кодов. В некоторых вариантах реализации штрих-коды используются для идентификации признаков процессов, например, экспериментов, в которых члены библиотеки подвергались скринингу. Примеры признаков включают мишени (например, белки, нуклеиновые кислоты, клетки и т.д.), буферные условия, партнеров по связыванию, конкурентов, включенных в скрининги, температуру экспериментов, продолжительность экспериментов, процедуры отмывки и/или другие характеристики экспериментальных процедур. В некоторых

вариантах реализации штрих-коды используются для идентификации сшивающих агентов, например, используемых для получения химически модифицированных фаговых библиотек, содержащих сшитые пептиды.

[162] Могут быть применены различные технологии для включения неприродных аминокислот в пептиды, коллекции (например, различные библиотеки, описанные в данном документе) и т.д. в соответствии с данным изобретением. В некоторых вариантах реализации включение включает применение подавления кодонов и/или пар аминоацил-тРНК-синтетаза/тРНК, которые приводят к включению неприродных аминокислот. В некоторых вариантах реализации пригодные способы включают добавление глифосата (или других агентов, которые избирательно подавляют биосинтез одной или нескольких аминокислот) и неприродной аминокислоты (аминокислот) в питательные среды. В некоторых вариантах реализации полезные способы включают применение клеточных линий, лишенных способности синтезировать определенные аминокислоты, и добавление неприродной аминокислоты (аминокислот) в питательные среды. В некоторых вариантах реализации полезные способы включают добавление неприродной аминокислоты (аминокислот) в питательную среду. В некоторых вариантах реализации штрих-коды используются для идентификации включения неприродных аминокислот в конструкции библиотек.

[163] В некоторых вариантах реализации известную фаговую или ДНК-последовательность (последовательности) добавляют на этапе фагового скрининга с целью масштабирования или нормализации данных секвенирования ДНК с применением известной последовательности (последовательностей) (образцы с добавкой контрольного зонда).

[164] В некоторых вариантах реализации в контексте коллекции пептидов (или белков и т.д.; например, предоставленной библиотеки) разнообразие может относиться либо к а) фактическому количеству уникальных аминокислотных последовательностей, присутствующих в указанной коллекции пептидов, либо к b) теоретическому количеству возможно существующих уникальных аминокислотных последовательностей, например, на основе дизайна и/или подготовки коллекции. В некоторых вариантах реализации разнообразие - это фактическое разнообразие, например, как измерено и описано в примерах.

[165] В некоторых вариантах реализации описанная в данном документе коллекция пептидов характеризуется фактическим разнообразием, составляющим по меньшей мере 1×10^4 уникальных пептидных последовательностей. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов характеризуется фактическим разнообразием, составляющим по

меньшей мере 1×10^5 уникальных пептидных последовательностей. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов характеризуется фактическим разнообразием, составляющим по меньшей мере 1×10^6 уникальных пептидных последовательностей. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов характеризуется фактическим разнообразием, составляющим по меньшей мере 1×10^7 уникальных пептидных последовательностей. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов характеризуется фактическим разнообразием, составляющим по меньшей мере 1×10^8 уникальных пептидных последовательностей. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов характеризуется фактическим разнообразием, составляющим по меньшей мере 1×10^9 уникальных пептидных последовательностей. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов характеризуется фактическим разнообразием, составляющим по меньшей мере 1×10^{10} уникальных пептидных последовательностей. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов характеризуется фактическим разнообразием, составляющим по меньшей мере 1×10^{11} уникальных пептидных последовательностей. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов характеризуется фактическим разнообразием, составляющим по меньшей мере 1×10^{12} уникальных пептидных последовательностей. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов характеризуется фактическим разнообразием, составляющим по меньшей мере 1×10^{13} уникальных пептидных последовательностей. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов характеризуется фактическим разнообразием, составляющим по меньшей мере 1×10^{14} уникальных пептидных последовательностей. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов характеризуется фактическим разнообразием, составляющим по меньшей мере 1×10^{15} уникальных пептидных последовательностей. В некоторых вариантах реализации предпочтительное фактическое разнообразие для коллекции пептидов, например, библиотеки, составляет 10^8 - 10^9 уникальных пептидных последовательностей. В некоторых вариантах реализации, такая коллекция может иметь теоретическое разнообразие, которое часто в 1000-10000 раз больше фактического разнообразия, например, 10 положений с 16 возможными аминокислотами в каждом положении могут иметь теоретическое разнообразие, равное 10^{12} ; в зависимости от процедур, цели и т.д., коллекция пептидов, например, библиотеки может быть приготовлена с подмножеством теоретического разнообразия, например, составляющим 10^8 уникальных последовательностей.

[166] В некоторых вариантах реализации одно или несколько, или каждое из положений аминокислотных остатков, являются рандомизированными. В некоторых вариантах реализации в рандомизированном положении различные аминокислотные

остатки независимо представлены в коллекции пептидов (например, в библиотеке, описанной в примере). В некоторых вариантах реализации каждое положение рандомизировано. В некоторых вариантах реализации предусматривается коллекция без предпочтений аминокислотных остатков в любых положениях (например, в некоторых вариантах реализации «наивная» или «непредвзятая» коллекция/библиотека). Как понятно специалистам в данной области, включение рандомизированных положений в некоторых вариантах реализации может быть выполнено путем кодирования вырожденного кодона в олигонуклеотидном праймере, используемом для создания библиотеки, например, NNN или NNK, где N = A, T, C, G, и K = T, G. В качестве альтернативы, рандомизированные положения могут быть включены путем применения смесей тримеров фосфоамидитов, например, доступных от фирмы Glen Research, где определенная смесь кодонов тримеров, которые кодируют соответствующую определенную смесь аминокислот, включены в олигонуклеотидный праймер, используемый для создания библиотеки. Например, библиотека может быть создана с применением смеси всех 20 природных аминокислот или, альтернативно, с применением какого-либо подмножества всех 20 природных аминокислот (например, A, D, E, F, H, I, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y и т.д.). В некоторых вариантах реализации неприродные аминокислоты могут быть также включены с применением различных технологий.

[167] В некоторых вариантах реализации пептиды коллекции, например, библиотеки, содержат фиксированные или подгруппу предпочтительных аминокислот в одном или нескольких положениях для одного или нескольких желаемых свойств и/или активностей, например, в некоторых вариантах реализации, благоприятствующих альфа-спиральной конформации. Например, включение остатков аланина в определенных положениях в середине пептида (например, конструкции библиотек b), e) и h), описанные выше), пролина на N-конце (например, конструкции библиотек g), h), i) выше) или аспарагиновой кислоты, а за ней пролина на N-конце (например, конструкции библиотек d), e), f) в приведенном выше списке). В некоторых вариантах реализации желаемое свойство или активность представляет собой связывание с конкретной мишенью (например, белком, нуклеиновой кислотой и т.д.). В некоторых вариантах реализации желаемое свойство или активность представляет собой проникновение в клетки. В некоторых вариантах реализации желаемое свойство или активность представляет собой стабильность (например, к протеазам или другим типам деградации). В некоторых вариантах реализации желаемое свойство или активность представляет собой низкую иммуногенность. В некоторых вариантах реализации желаемое свойство или активность представляет собой улучшенную физико-химическую характеристику. В некоторых

вариантах реализации желаемое свойство или активность представляют собой улучшенные фармакокинетические свойства. В некоторых вариантах реализации желаемое свойство или активность представляет собой селективность в отношении мишени или ткани. Как понятно специалистам в данной области техники, фиксированные и/или подмножество предпочтительных аминокислот может быть независимо представлено в каждом из одного или нескольких положений, чтобы обеспечить одно или несколько желаемых свойств и/или активностей.

[168] В некоторых вариантах реализации коллекции, например, библиотеки пептидов, могут быть созданы на основе одной или нескольких предпочтительных или исходных последовательностей. В некоторых вариантах реализации исходная последовательность систематически диверсифицируется для получения множества членов коллекции. В некоторых вариантах реализации исходная последовательность подвергается «аланиновому сканированию», при котором каждый остаток в последовательности заменяется на аланин либо индивидуально, либо в комбинации с другими изменениями, мутациями и/или модификациями, для получения ряда пептидов в коллекции. В некоторых вариантах реализации аланиновое сканирование полезно для оценки важности одного или нескольких остатков для определенных свойств и/или активностей, например, связывания, взаимодействий, стабильности, физико-химических свойств, проникновения в клетки, иммуногенности, селективности (например, к мишени (например, белку, нуклеиновой кислоте и т.д.), ткани и т.д.), фармакокинетических свойств и т.д. Исходная последовательность аналогичным образом может быть систематически изменена/мутирована на пролин или глицин, например, для оценки эффекта структурных и/или конформационных изменений. Родительская последовательность также может быть систематически изменена/мутирована на заряженные остатки, например, для исследования роли заряда в связывании, стабильности, физико-химических свойствах, проникновении в клетки, иммуногенности, селективности, фармакокинетических свойствах и т.д. Исходная последовательность также может быть систематически изменена/мутирована в каждом положении на множество аминокислот, например, для выявления точечных мутаций с улучшенными свойствами и/или активностями, например, связыванием, стабильностью, физико-химическими свойствами, проникновением в клетки, иммуногенностью, селективностью, фармакокинетическими свойствами и т.д. Специалистам в данной области будет понятно, что коллекции могут быть созданы с применением различных установленных методов библиотечного мутагенеза и направленной эволюции в соответствии с данным изобретением.

[169] В некоторых вариантах реализации исходная последовательность представляет собой панкреатический полипептид, нейропептид Y или пептид YY, или их фрагмент. В некоторых вариантах реализации фрагмент имеет длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислотных остатков. Например, в некоторых вариантах реализации последовательность выбирают из:

Таблица S-1

Вид	Последовательность
<i>Homo sapiens</i> (человек разумный)	PSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALGHYINLIT
<i>Ictalurus punctatus</i> (сом канальный)	PSKPENPGEDAAPEELAKYYTALRHYINLIT
<i>Marmota marmota</i> (сурок альпийский)	PLEPVYPGDNATPEQMAQYAAELRRYINMLT
<i>Myotis lucifugus</i> (ночница малая бурая)	PSKPEKPGENASAEELARYYSALRHYINLIT
<i>Betta splendens</i> (рыбка бойцовская сиамская)	PPKPENPGEDAPPEELAKYYTALRHYINLIT
<i>Notechis scutatus</i> (змея тигровая)	PPKPESPGENASPEEMAKYLADLRHYINLVT
<i>Orcinus orca</i> (косатка)	PAKPEAPGSHASPEELKRYYLRLHFLNLVT
<i>Calypste anna</i> (калитта Анны)	PPKPETPGDEASPEEVAKYFSALRHYINLVT
<i>Podarcis muralis</i> (ящерица стенная обыкновенная)	PQQPEHPGEDASAEEMARYLSALRHYLNLT
<i>Vombatus ursinus</i> (вombat короткошерстный)	PSKPKPPSENASREELSRYYAALRQYLNLT
<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (утконос)	PVKPQPPPDNATPEELAQYFASLRHYLNLT
<i>Otolemur garnettii</i> (галаго толстохвостый)	PLEPVYPGENATPEQMAQYAAELRRYINMLT
<i>Gulo gulo</i> (росомаха)	PSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLIT
<i>Crocodylus porosus</i> (крокодил гребнистый)	PSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLIT

[170] В некоторых вариантах реализации исходная последовательность

представляет собой последовательность, которая имеет определенный уровень гомологии с другой последовательностью, например, с последовательностями панкреатического полипептида, указанными выше. В некоторых вариантах реализации уровень составляет 85%, 90%, 95% или больше. В некоторых вариантах реализации уровень равен 90%. В некоторых вариантах реализации, уровень равен 95%. В некоторых вариантах реализации аминокислотные последовательности сшитых пептидов идентичны исходным последовательностям, за исключением того, что один или несколько остатков исходных последовательностей заменены остатками для сшивания (например, остатками цистеина для сшивания цистеином, как описано в данном документе). В некоторых вариантах реализации аминокислотные последовательности сшитых пептидов идентичны исходным последовательностям, за исключением того, что два или больше остатков исходных последовательностей заменены остатками для сшивания. В некоторых вариантах реализации, аминокислотные последовательности сшитых пептидов идентичны исходным последовательностям, за исключением того, что два остатка исходных последовательностей заменены остатками для сшивания.

[171] В некоторых вариантах реализации коллекции пептидов, например, различные библиотеки, основаны на панкреатических полипептидах. В некоторых вариантах реализации библиотеки панкреатических полипептидов включают рандомизацию одного или нескольких остатков в альфа-спиральной области. В некоторых вариантах реализации, библиотеки панкреатического полипептида, нейропептида Y или пептида YY включают рандомизацию одного или нескольких остатков в области РРП. В некоторых вариантах реализации, библиотеки панкреатического полипептида, нейропептида Y или пептида YY включают рандомизацию одного или нескольких остатков в области петли. В некоторых вариантах реализации, библиотеки панкреатического полипептида, нейропептида Y или пептида YY включают рандомизацию одного или нескольких остатков в двух или более областях пептида. В некоторых вариантах реализации такие библиотеки получают путем рандомизации остатков в одной или нескольких областях.

[172] В некоторых вариантах реализации панкреатический полипептид, нейропептид Y или пептид YY получен от *Homo sapiens*. В некоторых вариантах реализации панкреатический полипептид, нейропептид Y или пептид YY получен от *Ictalurus punctatus*. В некоторых вариантах реализации панкреатический полипептид, нейропептид Y или пептид YY получен от *Marmota marmota*. В некоторых вариантах реализации, панкреатический полипептид, нейропептид Y или пептид YY получен от *Myotis lucifugus*. В некоторых вариантах реализации, панкреатический полипептид,

нейропептид Y или пептид YY получен от *Betta splendens*. В некоторых вариантах реализации, панкреатический полипептид, нейропептид Y или пептид YY получен от *Notechis scutatus*. В некоторых вариантах реализации, панкреатический полипептид, нейропептид Y или пептид YY получен от *Orcinus orca*. В некоторых вариантах реализации, панкреатический полипептид, нейропептид Y или пептид YY получен от *Calyptra anna*. В некоторых вариантах реализации изобретения, структуры укладки белка с повышенной термостабильностью являются предпочтительными скаффолдами для рандомизации/генерирования библиотек. В некоторых вариантах реализации библиотеки, например, панкреатических полипептидов, получают путем рандомизации остатков встречающейся в природе структуры укладки панкреатического полипептида с высокой термостабильностью. В некоторых вариантах реализации библиотеки панкреатических полипептидов получают путем рандомизации остатков структуры укладки панкреатического полипептида, которая была модифицирована с целью повышения термостабильности.

[173] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает способы оптимизации пептида исходной последовательности. В некоторых вариантах реализации, данное изобретение предусматривает способы, включающие:

модификацию пептида путем замены каждого из одного или нескольких аминокислотных остатков независимо на другой аминокислотный остаток для получения модифицированного пептида, причем модифицированный пептид содержит по меньшей мере два остатка, пригодных для сшивания; и

сшивание двух остатков, пригодных для сшивания.

[174] В некоторых вариантах реализации пептид представляет собой или включает исходную последовательность, как описано в данном документе (например, последовательность пептида YY или ее фрагмент). В некоторых вариантах реализации два остатка, пригодные для сшивания, представляют собой остатки цистеина. В некоторых вариантах реализации два остатка цистеина сшиты, как описано в данном документе, например, с применением описанных в данном документе реагентов. В некоторых вариантах реализации модифицированный пептид обеспечивает улучшенные свойства и/или активность, например, улучшенную аффинность и/или селективность в отношении связывания с мишенью, улучшенную стабильность, улучшенное образование спирали, улучшенное проникновение в клетки и т.д. В некоторых вариантах реализации получают коллекцию модифицированных пептидов, например, путем рандомизации одного или нескольких остатков, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации коллекции модифицированных пептидов представлены в виде

библиотек фагового дисплея. В некоторых вариантах реализации члены таких коллекций/библиотек имеют сшивки, например, сшивки цистеинами, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает введение в контакт предложенных коллекций, библиотек или модифицированных пептидов с представляющей интерес мишенью, так чтобы один или несколько сшитых пептидов коллекции связались с мишенью, и определение аминокислотных последовательностей сшитых пептидов, которые связываются с мишенью, как описано в данном документе.

[175] Как будет понятно специалистам в данной области техники, предложенные технологии применимы к различным исходным последовательностям и/или спиральным скаффолдам. В некоторых вариантах реализации исходная последовательность представляет собой или является фрагментом (содержащим, например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислотных остатков), или представляет собой спиральный скаффолд из эксендина-4, пептидов *trp*-каркаса, пептидов ретро *trp*-каркаса, конотоксинов, сциллатоксинов, токсинов скорпиона, харибдотоксина, головки виллина, пептидов бета-альфа-бета-мотива, пептидов бета-бета-альфа-мотива, мастопарана, цинковых пальцев, скаффолдов спираль-линкер-спираль, скаффолдов лейциновых молний, скаффолдов панкреатических полипептидов, скаффолдов нейропептида Y, скаффолдов пептида YY, мутантов вышеупомянутых скаффолдов, которые были модифицированы для повышения стабилизации спирали, и других скаффолдов спиральных дисплеев из данной области техники. В некоторых вариантах реализации пептиды из предложенных коллекций содержат иницирующие или терминирующие последовательности спирали. В некоторых вариантах реализации пептиды предложенных коллекций содержат N-концевую лидерную последовательность, такую как AAA, DPA, NPA, APA, PA, P или AP, и/или C-концевую лидерную последовательность, такую как R, RR, RP, RG, GR, PR, G, GG, P, PP, GP или PG.

[176] В некоторых вариантах реализации цистеины включают в последовательности пептидов, например, отображаемых пептидов, с применением различных технологий дисплея. В некоторых вариантах реализации пептиды, которые связывают целевой пептид или белок в сайте, находящемся на близком расстоянии от одного или нескольких цистеинов на белке-мишени, могут быть идентифицированы посредством образования ковалентной связи между цистеином на пептиде и цистеином белка-мишени (например, на его поверхности) либо напрямую, либо через линкер (например, с применением различных реагентов, подходящих для сшивания остатков цистеина), что в некоторых вариантах реализации может привести к наблюдаемым

высокоаффинным и/или имеющим низкую скорость диссоциации взаимодействиям в анализе (например, скрининговом анализе для оценки связывания). Помимо прочего, идентификация таких цистеинов полезна для различных целей, например, для разработки агентов, которые могут взаимодействовать с мишенями (например, ковалентных ингибиторов мишеней), применения дисульфидного присоединения для синтеза библиотек, оптимизации соединений и т.д. Специалистам в данной области будет понятно, что в данной области доступны различные варианты применения цистеинов мишеней, например, поверхностных цистеинов на мишенях.

[177] Пептиды по данному изобретению могут иметь различные последовательности. Полезные последовательности могут иметь разное процентное содержание и/или количество одного или нескольких аминокислотных остатков. Например, в некоторых вариантах реализации последовательность содержит 2 и не более 2 остатков цистеина (будь то сшитых или нет). В некоторых вариантах реализации, последовательность содержит больше 2 остатков цистеина (будь то сшитых или нет). В некоторых вариантах реализации последовательность содержит 2 и не более 2 сшитых остатков цистеина. В некоторых вариантах реализации, последовательность содержит больше 2 сшитых остатков цистеина. В некоторых вариантах реализации процент сшитых остатков цистеина в последовательности составляет 5-50%. В некоторых вариантах реализации, процентное содержание составляет не более 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или 50%. В некоторых вариантах реализации, процентное содержание составляет примерно 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или 50%. В некоторых вариантах реализации процентное содержание составляет примерно или не более примерно 5%. В некоторых вариантах реализации процентное содержание составляет примерно или не более примерно 6%. В некоторых вариантах реализации процентное содержание составляет примерно или не более примерно 7%. В некоторых вариантах реализации процентное содержание составляет примерно или не более примерно 8%. В некоторых вариантах реализации процентное содержание составляет примерно или не более примерно 9%. В некоторых вариантах реализации процентное содержание составляет примерно или не более примерно 10%. В некоторых вариантах реализации процентное содержание составляет примерно или не более примерно 11%. В некоторых вариантах реализации процентное содержание составляет примерно или не более примерно 12%. В некоторых вариантах реализации процентное содержание составляет примерно или не более примерно 13%. В некоторых вариантах реализации процентное содержание составляет примерно или не более примерно 14%. В некоторых вариантах реализации

процентное содержание составляет примерно или не более примерно 15%. В некоторых вариантах реализации процентное содержание составляет примерно или не более примерно 20%.

[178] В некоторых вариантах реализации коллекции пептидов, например, предложенные библиотеки пептидов, используются для скрининга пептидов с определенными свойствами и/или активностями. Различные технологии скрининга описаны в данной области техники и могут применяться в соответствии с данным изобретением. В некоторых вариантах реализации библиотеку используют для скрининга мишени, например, белка, нуклеиновой кислоты и т.д. В некоторых вариантах реализации все аминокислотные остатки в мишени представляют собой аминокислоты в D-конфигурации (например, дисплей зеркального отображения). В некоторых вариантах реализации библиотеки используют для скрининга клеток, например, образцов клеток, клеток, выращенных в культуре и т.д., или *in vivo*, с применением различных технологий, описанных в данной области. В некоторых вариантах реализации библиотеки используют для скрининга клеток человека. В некоторых вариантах реализации библиотеки используют для скрининга у живого млекопитающего. В некоторых вариантах реализации библиотеки используют для скрининга у живого примата.

[179] В некоторых вариантах реализации библиотеки используют для скрининга аффинности связывания с мишенями, например, белками, нуклеиновыми кислотами и т.д. В некоторых вариантах реализации библиотеки используют для скрининга на селективность в отношении одной мишени (например, белка) по сравнению с другой мишенью (например, белком). В некоторых вариантах реализации библиотеки используют для скрининга на одну или несколько желаемых характеристик, таких как стабильность, физико-химические свойства, проникновение в клетки, иммуногенность (например, низкая иммуногенность), фармакокинетические свойства и т.д. В некоторых вариантах реализации библиотеки используют для скрининга на аффинность к липидам, для оптимизации физико-химических свойств и/или проникновения в клетки. В некоторых вариантах реализации библиотеки используют для скрининга иммобилизованных липидов, для оптимизации физико-химических свойств и/или проникновения в клетки. В некоторых вариантах реализации библиотеки используют для скрининга прохождения через гематоэнцефалический барьер или невральные барьеры либо *in vivo*, либо с помощью *in vitro* моделей гематоэнцефалического барьера или невральных барьеров. В некоторых вариантах реализации библиотеки используют для скрининга прохождения через кишечные или другие соответствующих эпителиальных клеток, либо *in vivo*, либо на *in vitro* моделях кишечных или других соответствующих

эпителиальных клеток. В некоторых вариантах реализации библиотеки используют для скрининга с применением моделей органоидов.

[180] В некоторых вариантах реализации скрининг проводят в буферах, которые были оптимизированы, например, для мишеней (например, белков, клеток и т.д.), являющихся объектами скрининга. В некоторых вариантах реализации скрининг проводят в буферах, которые снижают неспецифическое связывание, например, в буферах, содержащих бычий сывороточный альбумин, бычий гамма-глобулин, коллаген и фрагментированный в результате гидродинамического сдвига коллаген, белки молока, рандомизированные смеси синтетических пептидов, лизаты бактерий или клеток млекопитающих, лизаты или белковые препараты, подвергнутые ограниченному протеолизу, поли(дезоксидезоксирибонуклеиновую-дезоксидезоксицитидиловую) кислоту, ДНК спермы лосося, фрагментированную в результате гидродинамического сдвига ДНК, полилизин, глицерин, трегалозу, детергенты, такие как Тритон X-100, NP-40, Твин-20, Твин-80, Плурионик (Pluronic) F-127, октил-бета-D-глюкопиранозид и т.д. Дополнительные примеры добавок известны специалистам в данной области и могут быть применены в соответствии с данным изобретением.

[181] С применением описанных в данном документе технологий, например, пептидных коллекций (библиотек), скрининга и т.д., были идентифицированы пептидные связывающие агенты для различных белковых мишеней (например, бета-катенина (CTNNB1), CBL, CBLB, TEAD4, ERG).

[182] В некоторых вариантах реализации сшитые пептиды или их коллекции можно оценивать относительно эталонных пептидов и/или их коллекций. В некоторых вариантах реализации эталонный пептид представляет собой несшитый пептид. В некоторых вариантах реализации эталонный пептид представляет собой несшитый пептид с такой же или сопоставимой последовательностью. В некоторых вариантах реализации пептид представляет собой пептид, содержащий цистеиновую сшивку, а эталонный пептид не имеет такой цистеиновой сшивки. В некоторых вариантах реализации эталонный пептид не содержит цистеинов, используемых при сшивании цистеинами. В некоторых вариантах реализации эталонный пептид не содержит области РРП панкреатического полипептида, нейропептида Y или пептида YY, которую можно применять для стабилизации спиральных структур.

[183] В некоторых вариантах реализации описанная в данном документе коллекция пептидов характеризуется определенной избыточностью. В некоторых вариантах реализации избыточность в контексте коллекции пептидов (или белков и т.д.; например, предложенной библиотеки) относится к числу копий уникальной аминокислотной

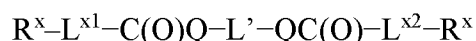
последовательности в указанной коллекции пептидов. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов, описанная в данном документе, характеризуется избыточностью, составляющей по меньшей мере 10000. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов, описанная в данном документе, характеризуется избыточностью, составляющей по меньшей мере 5000. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов, описанная в данном документе, характеризуется избыточностью, составляющей по меньшей мере 1000. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов, описанная в данном документе, характеризуется избыточностью, составляющей по меньшей мере 500. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов, описанная в данном документе, характеризуется избыточностью, составляющей по меньшей мере 100. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов, описанная в данном документе, характеризуется избыточностью, составляющей по меньшей мере 50. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов, описанная в данном документе, характеризуется избыточностью, составляющей по меньшей мере 10. В некоторых вариантах реализации описанная в данном документе коллекция пептидов характеризуется избыточностью, равной по меньшей мере 1. В некоторых вариантах реализации предпочтительная избыточность в отношении фактического разнообразия составляет 100-1000 фагов для каждой уникальной последовательности в данном образце для скрининга, что обеспечивает хорошую передискретизацию каждой последовательности. Например, библиотека из 10^8 последовательностей и 1000 фагов на последовательность будет содержать 10^{11} фаговых частиц; при типичном скрининге 48 образцов, таким образом, общее количество фагов будет составлять $4,8 * 10^{12}$.

[184] В некоторых вариантах реализации коллекция пептидов содержит «добавленный» (в известном количестве) стандарт. В некоторых вариантах реализации добавленный стандарт добавляют к коллекции пептидов после скрининга и до секвенирования идентифицирующих последовательностей нуклеиновых кислот (например, кодирующих пептиды) указанной коллекции пептидов. В некоторых вариантах реализации добавленный стандарт представляет собой добавленный в известном количестве фаг. В некоторых вариантах реализации добавленный стандарт представляет собой добавленную в известном количестве нуклеотидную последовательность. В некоторых вариантах реализации добавленный стандарт служит внутренним стандартом. В некоторых вариантах реализации добавленный стандарт позволяет измерять обогащение определенных аминокислотных последовательностей.

[185] В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов может быть обеспечена и/или применена в формате фагового дисплея. В некоторых вариантах

реализации, данное изобретение предусматривает способ, включающий стадии:

- i) экспрессии в клетке нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая: имеет длину в диапазоне от a^* до b^* аминокислотных остатков, включает по меньшей мере одну пару остатков цистеина, разделенных от 2 до 15 аминокислотными остатками, причем нуклеиновая кислота кодирует слитый белок, который встроен в фаговую частицу;
- ii) выделения фаговых частиц из клетки; и
- iii) введения в контакт фаговых частиц со сшивающим агентом, например, имеющим структуру $R^x-L^{s2}-R^x$, или его солью, или формулу **R-I**:



R-I,

или его солью, где:

a^* , b^* , и R^x , Q и L' описаны в данном изобретении.

[186] В некоторых вариантах реализации сшивающий агент представляет собой реагент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах реализации сшивающий агент представляет собой соединение, имеющее структуру $R^E-L^{s2}-R^E$, или его соль. В некоторых вариантах реализации, сшивающий агент представляет собой соединение, имеющее структуру $R^E-L^{x1}-C(O)Q-L'-QC(O)-L^{x2}-R^E$, или его соль. В некоторых вариантах реализации, сшивающий агент представляет собой соединение, имеющее структуру $R^E-C(O)Q-L'-QC(O)-R^E$, или его соль. В некоторых вариантах реализации, сшивающий агент представляет собой соединение, имеющее структуру $R^x-L^{s2}-R^x$, или его соль. В некоторых вариантах реализации, сшивающий агент представляет собой соединение, имеющее структуру $R^x-L^{x1}-C(O)Q-L'-QC(O)-L^{x2}-R^x$, или его соль.

[187] В некоторых вариантах реализации, данное изобретение предусматривает способ, дополнительно включающий стадии:

- iv) введения в контакт коллекции пептидов с представляющей интерес мишенью, так чтобы один или несколько сшитых пептидов коллекции связывались мишенью, с представляющей интерес; и
- v) определения аминокислотных последовательностей сшитых пептидов, которые связываются с представляющей интерес мишенью.

[188] В некоторых вариантах реализации каждая отдельно взятая аминокислотная последовательность связана с идентификатором, так чтобы каждую аминокислотную последовательность можно было независимо идентифицировать. В некоторых вариантах реализации каждая аминокислотная последовательность независимо связана с идентификатором, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты,

кодирующую аминокислотную последовательность или ее часть (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или больше необязательно последовательно расположенных аминокислотных остатков, или 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше ее аминокислотной последовательности). В некоторых вариантах реализации связь является ковалентной. В некоторых вариантах реализации связь осуществляется посредством дискретной системы, содержащей аминокислотную последовательность и ее идентификатор. В некоторых вариантах реализации система представляет собой клетку, фаг и т.д., которые содержат и/или экспрессируют аминокислотную последовательность и ее идентификатор. В некоторых вариантах реализации определение аминокислотной последовательности включает определение нуклеотидных последовательностей, которые кодируют пептиды гибридного белка, включенного в фаговую частицу. В некоторых вариантах реализации определение аминокислотных последовательностей включает применение высокопроизводительного секвенирования нуклеиновых кислот, кодирующих аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах реализации высокопроизводительное секвенирование включает секвенирование отдельной молекулы в реальном времени, ионное полупроводниковое секвенирование (например, секвенирование ионного потока), пиросеквенирование, секвенирование путем синтеза, секвенирование путем лигирования (например, секвенирование SOLiD (секвенирование путем лигирования и обнаружения олигонуклеотидов)), нанопоровое секвенирование и т.д. Как понятно специалистам в данной области техники, могут применяться различные технологии высокопроизводительного секвенирования в соответствии с данным изобретением. В некоторых вариантах реализации данное изобретение признает, что технологии, предшествующие данному изобретению, могут быть жестко и по своему характеру ограничены, и во многих случаях не могут быть успешно осуществлены при применении библиотек, содержащих большое количество разнообразных аминокислотных последовательностей, поскольку, например, аминокислотные последовательности с желаемыми свойствами и/или активностями не могут быть легко идентифицированы из-за фонового шума, например, вследствие ограниченного числа последовательностей, которые могут быть проанализированы индивидуально. Помимо прочего, данное описание демонстрирует, что комбинация пептидных библиотек и высокопроизводительного секвенирования соответствующих кодирующих последовательностей нуклеиновых кислот является особенно эффективной для скрининга пептидных библиотек, содержащих большое количество разнообразных последовательностей, и идентификации из таких библиотек полезных аминокислотных

последовательностей, в некоторых случаях, аминокислотных последовательностей, очень сильно отличающихся или полностью отличных от природных аминокислотных последовательностей. В некоторых вариантах реализации предусматриваемые технологии значительно повышают пропускную способность и/или обеспечивают возможность анализа/оценки многих последовательностей-кандидатов на беспрецедентном уровне.

[189] В некоторых вариантах реализации, данное изобретение предусматривает способ, дополнительно включающий стадии:

vi) синтеза новой коллекции пептидов на основе паттернов, наблюдаемых во время определения аминокислотных последовательностей сшитых пептидов, которые связываются с представляющей интерес мишенью.

[190] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает способ, включающий идентификацию или характеристику связывающего агента, специфичного для представляющей интерес мишени, причем указанный способ включает стадии введения в контакт представляющей интерес мишени с членами коллекции сшитых пептидов; и детектирование специфического связывания одного или нескольких указанных членов с мишенью.

[191] В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов представляет собой коллекцию полипептидов. В некоторых вариантах реализации коллекция пептидов представляет собой коллекцию полипептидов со вторичной структурой. В некоторых вариантах реализации, коллекция пептидов представляет собой коллекцию полипептидов с третичной структурой. В некоторых вариантах реализации, коллекция полипептидов представляет собой коллекцию белков. В некоторых вариантах реализации коллекция белков представляет собой коллекцию сшитых белков.

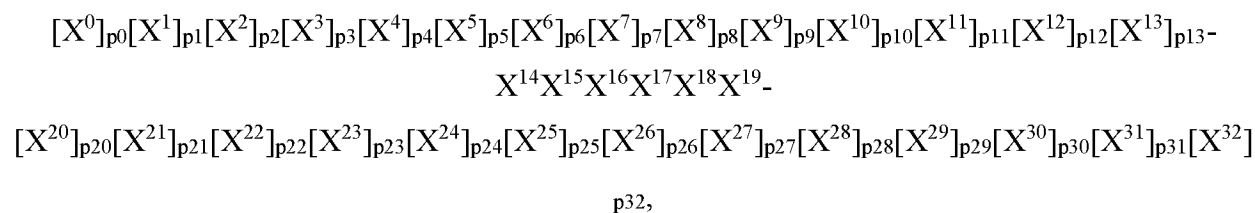
[192] Как описано в данном изобретении, в некоторых вариантах реализации пептиды в библиотеке содержат аминокислотные последовательности, например, для скрининга. В некоторых вариантах реализации такие аминокислотные последовательности содержат сшитые аминокислотные остатки. В некоторых вариантах реализации такие аминокислотные последовательности имеют одинаковую длину, и/или имеют сшивки в одинаковых положениях. В некоторых вариантах реализации аминокислотные последовательности в коллекции пептидов библиотеки содержат по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 случайных положений, причем аминокислотный остаток в каждом из таких положений может независимо представлять собой любой аминокислотный остаток (например, остаток природной аминокислоты). В некоторых

вариантах реализации присутствует не менее 5 случайных положений. В некоторых вариантах реализации присутствует не менее 6 случайных положений. В некоторых вариантах реализации присутствует не менее 7 случайных положений. В некоторых вариантах реализации присутствует не менее 8 случайных положений. В некоторых вариантах реализации присутствует не менее 9 случайных положений. В некоторых вариантах реализации присутствует не менее 10 случайных положений. В некоторых вариантах реализации присутствует не менее 11 случайных положений. В некоторых вариантах реализации присутствует не менее 12 случайных положений. В некоторых вариантах реализации присутствует не менее 13 случайных положений. В некоторых вариантах реализации присутствует не менее 14 случайных положений. В некоторых вариантах реализации присутствует не менее 15 случайных положений. В некоторых вариантах реализации присутствует не менее 16 случайных положений. В некоторых вариантах реализации присутствует не менее 17 случайных положений. В некоторых вариантах реализации каждый аминокислотный остаток, за исключением сшитых остатков, независимо является случайным. В некоторых вариантах реализации в коллекции пептидов библиотеки в случайном положении находится по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 различных аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации там находится по меньшей мере 2 различных аминокислотных остатка. В некоторых вариантах реализации там находится по меньшей мере 3 различных аминокислотных остатка. В некоторых вариантах реализации там находится по меньшей мере 4 различных аминокислотных остатка. В некоторых вариантах реализации там находится по меньшей мере 5 различных аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации там находится по меньшей мере 6 различных аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации там находится по меньшей мере 7 различных аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации там находится по меньшей мере 8 различных аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации там находится по меньшей мере 9 различных аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации там находится по меньшей мере 10 различных аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации там находится по меньшей мере 15 различных аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации там находится по меньшей мере 20 различных аминокислотных остатков.

Скаффолд библиотеки

[193] В некоторых вариантах реализации, данное изобретение предусматривает

коллекция пептидов структуры:



где:

X^0 - константная область скаффолда;

каждый из $p_0, p_1, p_2, p_3, p_4, p_5, p_6, p_7, p_8, p_9, p_{10}, p_{11}, p_{12}, p_{13}, p_{20}, p_{21}, p_{22}, p_{23}, p_{24}, p_{25}, p_{26}, p_{27}, p_{28}, p_{29}, p_{30}, p_{31}, p_{32}$ независимо равен 0 или 1;

каждый из X^1-X^{32} независимо представляет собой аминокислотный остаток;

по меньшей мере два из X^1-X^{32} содержат боковые цепи, которые необязательно связаны друг с другом с образованием сшивки.

[194] В некоторых вариантах реализации p_0 равен 0. В некоторых вариантах реализации p_0 равен 1.

[195] В некоторых вариантах реализации константная область скаффолда обеспечивает пептидную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% гомологична природной аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах реализации, гомология составляет по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах реализации, гомология составляет по меньшей мере 60%. В некоторых вариантах реализации, гомология составляет по меньшей мере 70%. В некоторых вариантах реализации, гомология составляет по меньшей мере 80%. В некоторых вариантах реализации, гомология составляет по меньшей мере 90%. В некоторых вариантах реализации, гомология составляет по меньшей мере 95%. В некоторых вариантах реализации константная область скаффолда содержит аминокислотную последовательность AGPAKPEAGEDASP.

Мишени, представляющие интерес

[196] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает реагенты, пептидные агенты и комбинации пептидов, которые взаимодействуют с представляющей интерес мишенью. В некоторых вариантах реализации представляющая интерес мишень является биомолекулой (например, белком, РНК, ДНК и т.д.), тканью или клеткой. В некоторых вариантах реализации представляющая интерес мишень имеет активность или характеристику, которая связана с заболеванием, расстройством или состоянием. В некоторых вариантах реализации представляющая интерес мишень является белком. В некоторых вариантах реализации представляющая интерес мишень

является белком, связанным с состоянием, расстройством или заболеванием, например, белком, связанным с раком. Многие мишени, связанные с различными состояниями, расстройствами или заболеваниями, известны в данной области и нацеливание на них может проводиться с применением технологий по данному изобретению.

[197] В некоторых вариантах реализации представляющая интерес мишень может быть объектом, который встречается в биологической системе или организме (например, человеку). В некоторых вариантах реализации представляющая интерес мишень может иметь известного партнера по взаимодействию. В некоторых вариантах реализации представляющая интерес мишень может не иметь какого-либо известного партнера по взаимодействию или может не иметь какого-либо известного партнера по взаимодействию, для которого связывающее взаимодействие с мишенью характеризуется одним или несколькими признаками, описанными в данном документе.

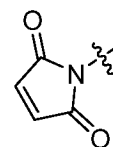
[198] В некоторых вариантах реализации представляющая интерес мишень может быть, или содержать, что-то одно или больше из бета-катенина и протоонкогена-b лимфомы В-линии Casitas (Cbl-b). В некоторых вариантах реализации представляющей интерес мишенью является бета-катенин. В некоторых вариантах реализации представляющей интерес мишенью является протоонкоген-b лимфомы В-линии Casitas (Cbl-b).

Реагенты

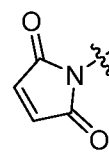
[199] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает реагенты, полезные для получения, идентификации, характеристики и/или применения сшитых пептидов (например, сшитых цистеином пептидов). В некоторых вариантах реализации предложенные реагенты являются особенно полезными, например, они обеспечивают высокие выходы и/или чистоту при применении в комбинации с биологической системой (например, системой, которая экспрессирует аминокислотные последовательности).

[200] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает соединения (например, которые могут применяться в качестве реагентов), имеющие структуру $R^E-L^{s2}-R^E$, или их соли, где каждая переменная имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации R^E представляет собой или содержит электрофильную группу. Как понятно специалистам в данной области, различные электрофильные группы являются известными и используются в данной области техники и могут применяться в соответствии с данным изобретением. В некоторых вариантах реализации электрофильная группа вступает в реакцию с $-SH$,

например, -SH боковой цепи аминокислоты, в подходящих условиях (например, при определенных условиях pH, используемых в данной области техники), в результате чего протекает реакция между группой -SH и электрофильной группой с образованием ковалентной связи между -S- и электрофильной группой. В некоторых вариантах реализации электрофильная группа содержит уходящую группу, связанную с атомом углерода, например, $-\text{CH}_2\text{R}^x$, где R^x представляет собой уходящую группу. В некоторых вариантах реализации -SH реагирует с $-\text{CH}_2\text{R}^x$ с образованием $-\text{CH}_2\text{-S-}$. В некоторых вариантах реализации электрофильная группа представляет собой или содержит двойную или тройную связь. В некоторых вариантах реализации двойная или тройная связь связана с одной или несколькими электроноакцепторными группами (например, одной или несколькими группами $-\text{C}(\text{O})-$). В некоторых вариантах реализации электрофильная группа представляет собой акцептор Михаэля (Michael). В некоторых вариантах

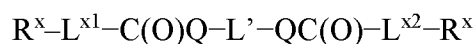


реализации, электрофильная группа представляет собой или содержит



в некоторых вариантах реализации, R^E представляет собой . В некоторых вариантах реализации R^E представляет собой $\text{R}^x-\text{L}^{x1}-$. В некоторых вариантах реализации два R^E в одной и той же молекуле являются одинаковыми. В некоторых вариантах реализации они разные. В некоторых вариантах реализации полезные для применения в качестве реагентов соединения имеют формулу $\text{R}^E-\text{L}^{x1}-\text{EWG}-\text{Q}-\text{L}'-\text{Q}-\text{EWG}-\text{L}^{x2}-\text{R}^E$, или являются их солями, где каждый EWG независимо является фрагментом электроноакцепторной группы (например, представляет собой или содержит $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$ и т.д.), и все остальные переменные независимо имеют значения, описанные в данном документе. В некоторых вариантах реализации полезные для применения в качестве реагентов соединения имеют формулу $\text{R}^E-\text{L}^{x1}-\text{C}(\text{O})\text{Q}-\text{L}'-\text{QC}(\text{O})-\text{L}^{x2}-\text{R}^E$, или являются их солями, где каждая переменная независимо имеет значения, описанные в данном документе. В некоторых вариантах реализации, полезные для применения в качестве реагентов соединения имеют формулу $\text{R}^E-\text{L}^{x1}-\text{SO}_2-\text{Q}-\text{L}'-\text{Q}-\text{SO}_2-\text{L}^{x2}-\text{R}^E$, или являются их солями, где каждая переменная независимо имеет значения, описанные в данном документе. В некоторых вариантах реализации, полезные для применения в качестве реагентов соединения имеют формулу $\text{R}^E-\text{EWG}-\text{Q}-\text{L}'-\text{Q}-\text{EWG}-\text{R}^E$, или являются их солями, где каждый EWG независимо является фрагментом электроноакцепторной группы (например, представляет собой или содержит $-\text{C}(\text{O})-$,

$-S(O)-$, $-S(O)_2-$ и т.д.), и все остальные переменные независимо имеют значения, описанные в данном документе. В некоторых вариантах реализации, полезные для применения в качестве реагентов соединения имеют формулу $R^E-C(O)Q-L'-QC(O)-R^E$, или являются их солями, где каждая переменная независимо имеет значения, описанные в данном документе. В некоторых вариантах реализации, полезные для применения в качестве реагентов соединения имеют формулу $R^E-SO_2-Q-L'-Q-SO_2-R^E$, или являются их солями, где каждая переменная независимо имеет значения, описанные в данном документе. В некоторых вариантах реализации, полезные для применения в качестве реагентов соединения имеют формулу $R^E-Q-L'-Q-R^E$, или являются их солями, где каждая переменная независимо имеет значения, описанные в данном документе. В некоторых вариантах реализации, данное изобретение предусматривает соединения (например, которые могут быть пригодны для применения в качестве реагентов), имеющие структуру $R^x-L^{s2}-R^x$, или их соли, где каждая переменная имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предлагаются соединения (например, которые могут быть применены в качестве реагентов), имеющие формулу **R-I**:



R-I

или их соли, где:

каждый R^x независимо представляет собой уходящую группу;

каждый Q независимо выбирают из ковалентной связи, $-N(R')-$, $-O-$ и $-S-$;

каждый из L^{x1} , L^{x2} и L' независимо представляет собой ковалентную связь или необязательно замещенную двухвалентную C_{1-20} алифатическую группу, в которой одно или несколько метиленовых звеньев алифатической группы необязательно и независимо замещены на $-C(R')_2-$, $-Cy-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')-$, $-C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$, $-C(O)S-$ или $-C(O)O-$;

каждый $-Cy-$ независимо представляет собой необязательно замещенную двухвалентную группу, выбранную из C_{3-20} циклоалифатического кольца, C_{6-20} арильного кольца, 5-20-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3-20-членного гетероциклического кольца, содержащего 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния;

каждый R' представляет собой $-R$, $-C(O)R$, $-CO_2R$ или $-SO_2R$;

каждый R независимо представляет собой $-H$ или необязательно замещенную группу,

выбранную из C_{1-30} алифатической, C_{1-30} гетероалифатической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, C_{6-30} арильной, C_{6-30} арилалифатической, C_{6-30} арилгетероалифатической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, 5-30-членной гетероарильной, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3-30-членной гетероциклической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, или

две группы R, необязательно и независимо, вместе образуют ковалентную связь; или две или более групп R на одном и том же атоме, необязательно и независимо, вместе с указанным атомом образуют необязательно замещенное 3-30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее, помимо указанного атома, 0-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния; или две или более групп R на двух или нескольких атомах, необязательно и независимо, вместе с промежуточными атомами между ними, образуют необязательно замещенное 3-30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее, в дополнение к промежуточным атомам, 0-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния; и

[201] Различные уходящие группы известны в данной области и могут применяться в соответствии с данным изобретением, например, как примеры осуществления R^x . В некоторых вариантах реализации уходящая группа, например, R^x , представляет собой галоген. В некоторых вариантах реализации R^x представляет собой -Cl. В некоторых вариантах реализации R^x представляет собой -Br. В некоторых вариантах реализации R^x представляет собой -I. В некоторых вариантах реализации уходящая группа представляет собой -OSO₂R (например, где R представляет собой необязательно замещенный алкил (например, перфторалкил, такой как -CF₃)), необязательно замещенный фенил и т.д.). В некоторых вариантах реализации уходящая группа представляет собой -OTs или -OMs.

[202] В некоторых вариантах реализации группы R^x в одном и том же соединении являются одинаковыми. В некоторых вариантах реализации группы R^x в одном и том же соединении являются разными.

[203] В некоторых вариантах реализации L^{x1} представляет собой необязательно замещенную метиленовую группу. В некоторых вариантах реализации L^{x1} представляет собой -CH₂-. В некоторых вариантах реализации, L^{x2} представляет собой необязательно замещенную метиленовую группу. В некоторых вариантах реализации, L^{x2} представляет собой -CH₂-. В некоторых вариантах реализации L^{x1} и L^{x2} одинаковы; в других

вариантах реализации они разные. В некоторых вариантах реализации как L^{x1} , так и L^{x2} представляют собой $-CH_2-$.

[204] В некоторых вариантах реализации, Q представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах реализации Q выбирают из ковалентной связи, $-N(R')-$, $-O-$ и $-S-$. В некоторых вариантах реализации, Q представляет собой $-N(R')-$, где R' описан в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации Q представляет собой $-O-$. В некоторых вариантах реализации, Q представляет собой $-S-$. В некоторых вариантах реализации, каждый Q представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах реализации каждый Q независимо выбирают из $-N(R')-$, $-O-$ и $-S-$. В некоторых вариантах реализации, каждый Q независимо представляет собой $-N(R')-$, где R' описан в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации каждый Q независимо представляет собой $-NH-$. В некоторых вариантах реализации каждый Q независимо представляет собой $-O-$. В некоторых вариантах реализации каждый Q независимо представляет собой $-S-$.

[205] В некоторых вариантах реализации $-Su-$ представляет собой необязательно замещенное бивалентное C_{3-20} циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации $-Su-$ представляет собой необязательно замещенное бивалентное C_{6-20} арильное кольцо. В некоторых вариантах реализации, $-Su-$ представляет собой необязательно замещенное бивалентное фенильное кольцо. В некоторых вариантах реализации $-Su-$ представляет собой необязательно замещенное 5-20-членное гетероарильное кольцо, содержащее 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах реализации, $-Su-$ представляет собой необязательно замещенное 3-20-членное гетероциклическое кольцо, содержащее 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах реализации $-Su-$ является моноциклическим. В некоторых вариантах реализации $-Su-$ является бициклическим. В некоторых вариантах реализации $-Su-$ является полициклическим. В некоторых вариантах реализации $-Su-$ включает одно или несколько необязательно замещенных гетероциклических колец, где каждое из гетероциклических колец независимо содержит один или несколько атомов азота, каждый из которых независимо связан с Q, или $-C(O)-$, когда Q является ковалентной связью. В некоторых вариантах реализации $-Su-$ является моноциклическим. В некоторых вариантах реализации $-Su-$ является бициклическим. В некоторых вариантах реализации $-Su-$ является полициклическим.

[206] В некоторых вариантах реализации для бициклического или полициклического кольца каждое из моноциклических колец независимо представляет

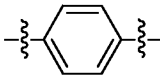
собой 3-10- (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10)-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-10 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) гетероатомов (например, в некоторых вариантах реализации, выбранных из азота, кислорода и серы), или 5-10- (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10)-членное ароматическое кольцо, содержащее 0-10 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) гетероатомов (например, в некоторых вариантах реализации, выбранных из азота, кислорода и серы).

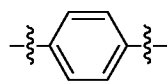
[207] В некоторых вариантах реализации L' представляет собой или содержит $-C_{10}-$. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой $-C_{10}-$.

[208] В некоторых вариантах реализации L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_{19} алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_{15} алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_{10} алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_9 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_8 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_7 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_6 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_5 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_3 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_2 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой $-CH_2-$. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой $-(CH_2)_2-$. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой $-(CH_2)_3-$. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой $-(CH_2)_4-$. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой $-(CH_2)_5-$. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой $-(CH_2)_6-$. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой $-(CH_2)_7-$. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой $-(CH_2)_8-$.

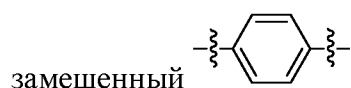
[209] В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенное двухвалентное C_6-20 арильное кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенное двухвалентное C_6-14 арильное кольцо. В

некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенное двухвалентное C₆₋₁₀ арильное кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенное двухвалентное C₆ арильное кольцо. В некоторых вариантах воплощения L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный по меньшей мере одной электроноакцепторной группой, как понятно специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный по меньшей мере одним галогеном. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный по меньшей мере двумя галогенами. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный по меньшей мере тремя галогенами. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный четырьмя галогенами. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный по меньшей мере одним атомом фтора. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентный C₆ -арил, замещенный по меньшей мере двумя атомами фтора. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный по меньшей мере тремя атомами фтора. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный четырьмя атомами фтора. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный по меньшей мере одним атомом хлора. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный по меньшей мере двумя атомами хлора. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный по меньшей мере тремя атомами хлора. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный четырьмя атомами хлора. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный по меньшей мере одной группой –O(CH₂)₀₋₄CH₃. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный по меньшей мере двумя группами –O(CH₂)₀₋₄CH₃. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный по меньшей мере тремя группами –O(CH₂)₀₋₄CH₃. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентный C₆-арил, замещенный четырьмя группами –O(CH₂)₀₋₄CH₃. В некоторых вариантах реализации L' является необязательно

замещенным . В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой



В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой



В некоторых вариантах реализации L' представляет собой



В некоторых вариантах реализации L' представляет собой



[210] В некоторых вариантах реализации L' включает или представляет собой двухвалентное 5-20-членное гетероарильное кольцо, содержащее 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентное 5-6-членное гетероарильное кольцо, содержащее 1-4 гетероатома, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентное 5-6-членное гетероарильное кольцо, содержащее 1-4 гетероатома, независимо выбранных из кислорода, азота и серы. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентное 6-членное гетероарильное кольцо, содержащее 1-2 гетероатома, независимо выбранных из кислорода, азота и серы. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой двухвалентное 6-членное гетероарильное кольцо, содержащее 2 атома азота.

[211] В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C₃₋₂₀ циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C₃₋₁₅ циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C₃₋₁₀ циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C₃₋₉ циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C₃₋₈ циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C₃₋₇ циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C₃₋₆ циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C₃₋₅ циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C₃₋₄ циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой

необязательно замещенное двухвалентное C_3 циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C_4 циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C_5 циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C_5 циклоалкильное кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C_5 циклоалкенильное кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C_6 циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой optionally замещенное двухвалентное C_6 циклоалкильное кольцо.

[212] В некоторых вариантах реализации L^{s2} содержит $-N(R')-L'-N(R')-$ и L' представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах реализации L^{s2} содержит $-N(R)-N(R)-$, где:

каждый R независимо представляет собой $-H$ или optionally замещенную группу, выбранную из C_{1-30} алифатической, C_{1-30} гетероалифатической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, C_{6-30} арильной, C_{6-30} арилалифатической, C_{6-30} арилгетероалифатической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, 5-30-членной гетероарильной, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3-30-членной гетероциклической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, или

две или более групп R на двух или нескольких атомах, optionally и независимо, вместе с промежуточными атомами между ними, образуют optionally замещенное 3-30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее, в дополнение к промежуточным атомам, 0-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния.

[213] В некоторых вариантах реализации L^{s2} содержит $-N(R)-N(R)-$, где:

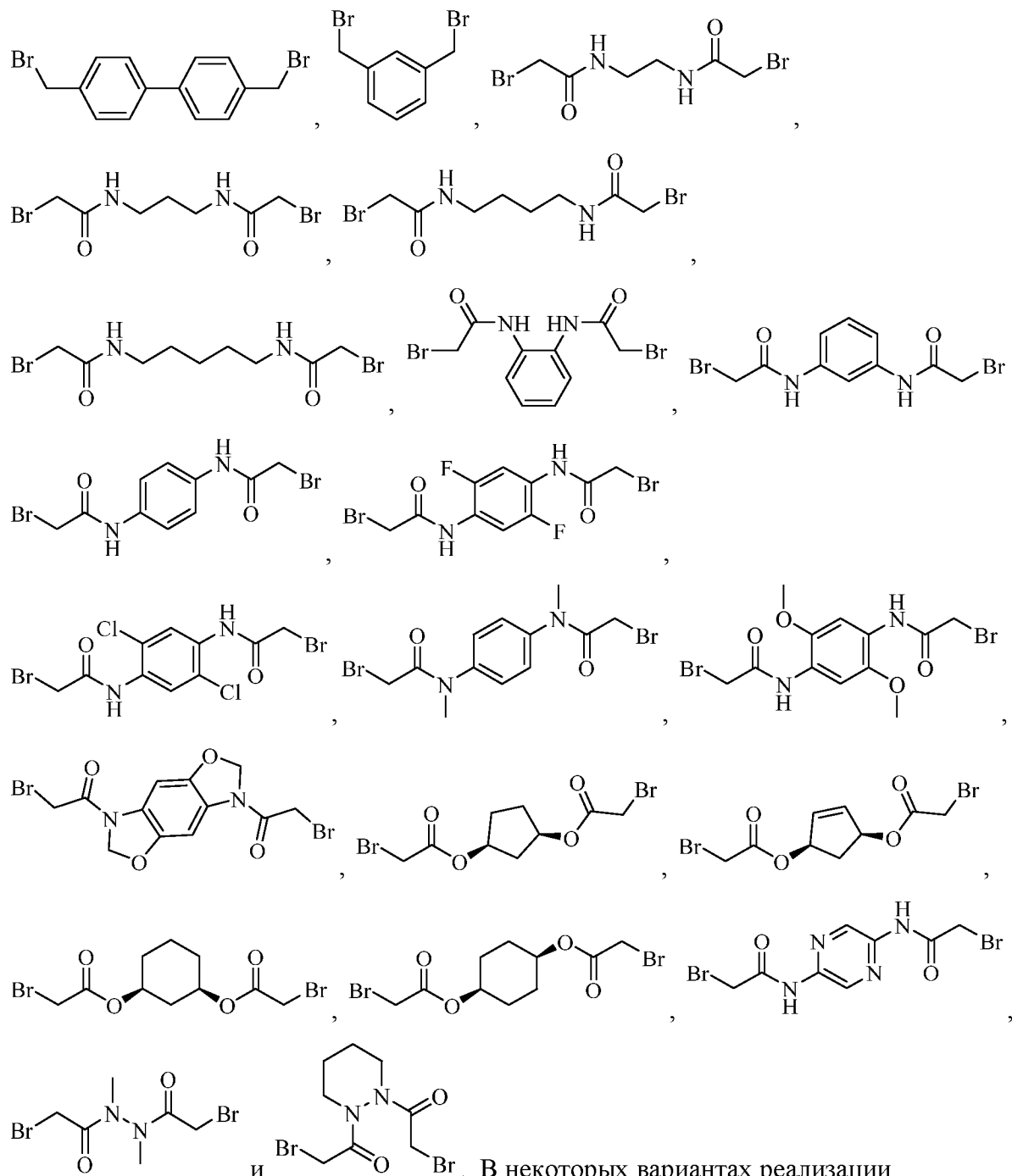
каждый R независимо optionally замещен C_{1-30} алифатической группой; или

две или более групп R на двух или более атомах, optionally и независимо, вместе с промежуточными атомами между ними, образуют optionally замещенное 3-30-членное моноциклическое кольцо.

[214] В некоторых вариантах реализации L^{s2} представляет собой $-L^{x1}-C(O)Q-L'-QC(O)-L^{x1}-$, где каждая переменная независимо имеет значение, описанное в данном

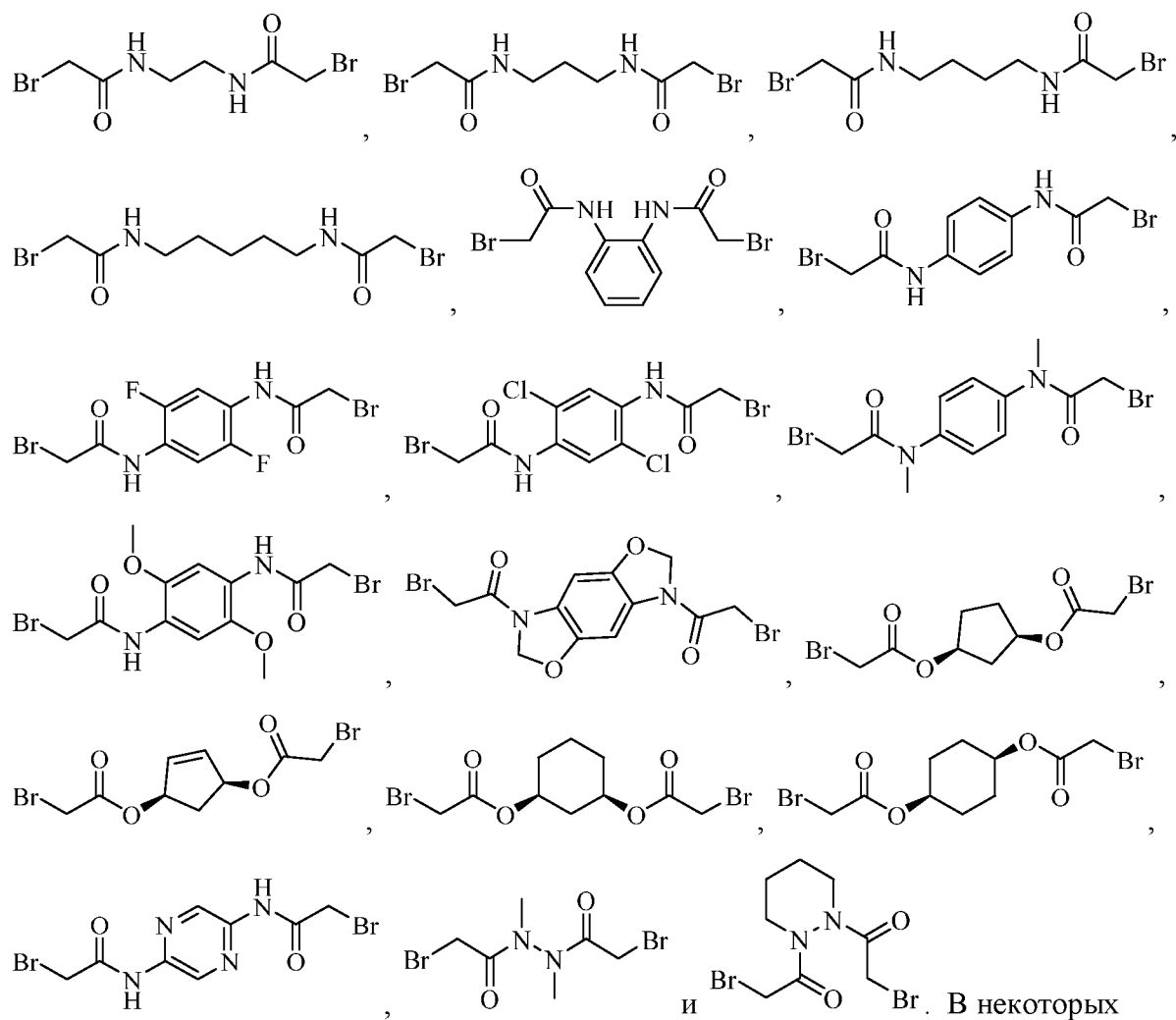
изобретении. В некоторых вариантах реализации L^{s2} представляет собой $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Q}-\text{L}'-\text{QC}(\text{O})\text{CH}_2-$, где каждый $-\text{CH}_2-$ независимо и необязательно является замещенным. В некоторых вариантах реализации L^{s2} представляет собой $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Q}-\text{L}'-\text{QC}(\text{O})\text{CH}_2-$. В некоторых вариантах реализации предлагаемое соединение, например, соединение $\text{R}^x-\text{L}^{s2}-\text{R}^x$, выбирают из группы, состоящей из:

Таблица 1

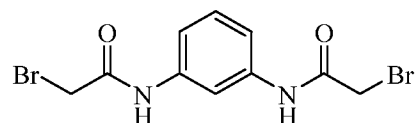
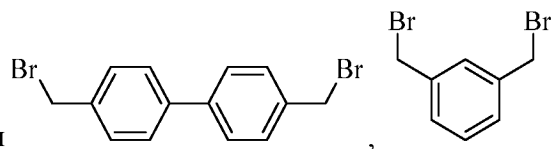


В некоторых вариантах реализации предложенное соединение, например, соединение $\text{R}^x-\text{L}^{s2}-\text{R}^x$, имеет структуру $\text{R}^x-\text{L}^{x1}-\text{C}(\text{O})\text{Q}-\text{L}'-\text{QC}(\text{O})-\text{L}^{x2}-\text{R}^x$ или $\text{R}^x-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Q}-\text{L}'-\text{QC}(\text{O})\text{CH}_2-\text{R}^x$, и выбрано из группы, состоящей из

Таблица 2:

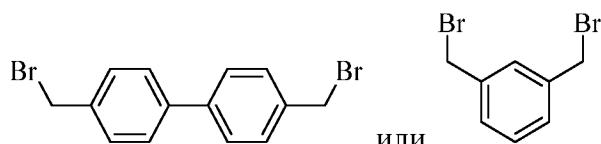


вариантах реализации соединение не является



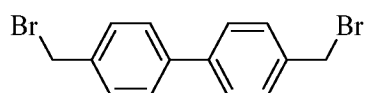
. В некоторых вариантах реализации, соединение не

является



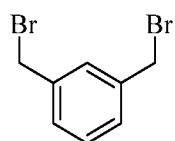
. В некоторых вариантах реализации,

соединение не является

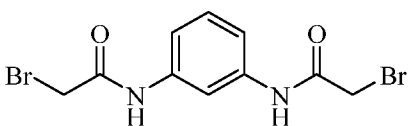


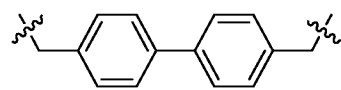
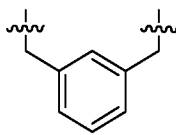
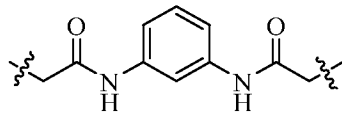
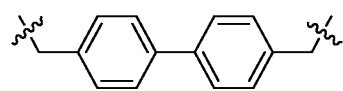
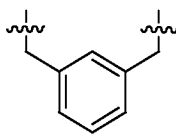
. В некоторых вариантах реализации,

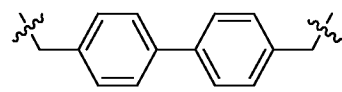
соединение не является

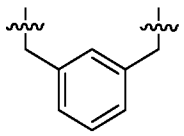


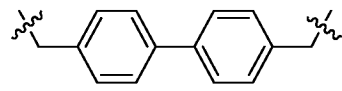
. В некоторых вариантах реализации, соединение не

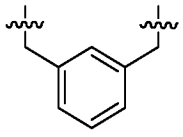
является . В некоторых вариантах реализации L^{s2} или $-CH_2C(O)Q-L'-QC(O)CH_2-$ такие, как описано в таких соединениях, где R^x представляет собой $-Br$. В некоторых вариантах реализации L^s или L^{s2} не являются

,  или . В некоторых вариантах реализации, L^s или L^{s2} не являются  или .

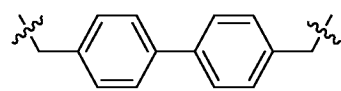
В некоторых вариантах реализации, L^s или L^{s2} не являются . В

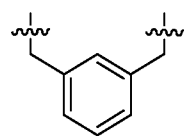
некоторых вариантах реализации, L^s или L^{s2} не являются . В некоторых

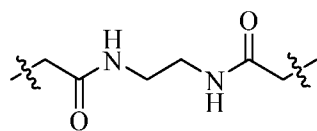
вариантах реализации, L^s или L^{s2} представляют собой . В

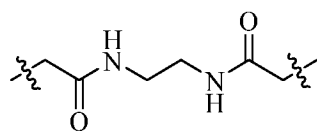
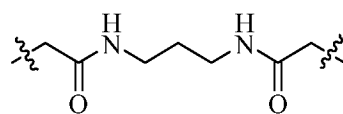
некоторых вариантах реализации, L^s или L^{s2} представляют собой . В

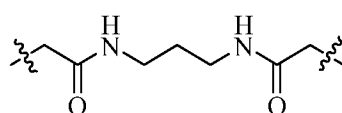
некоторых вариантах реализации, L^s или L^{s2} представляют собой замещенный

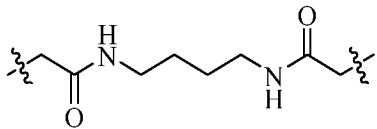
. В некоторых вариантах реализации, L^s или L^{s2} представляют

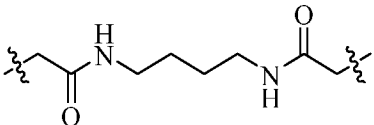
собой замещенный . В некоторых вариантах реализации, L^s или L^{s2} или $-L^{x1}-C(O)Q-L'-QC(O)-L^{x1}-$ или $-CH_2C(O)Q-L'-QC(O)CH_2-$ представляют собой

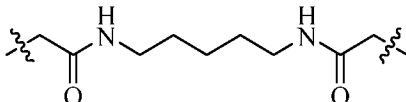
; в некоторых вариантах реализации, это замещенный

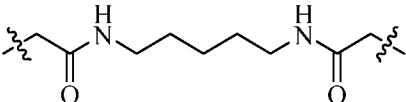
; в некоторых вариантах реализации, это ;

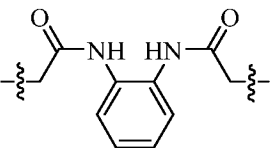
в некоторых вариантах реализации, это замещенный ; в

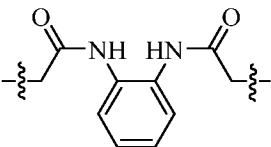
некоторых вариантах реализации, это  ; в некоторых вариантах

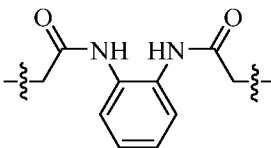
реализации, это замещенный  ; в некоторых вариантах

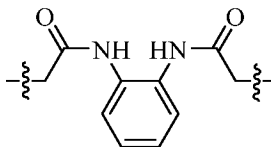
реализации, это  ; в некоторых вариантах реализации, это

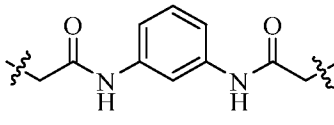
замещенный  ; в некоторых вариантах реализации, это

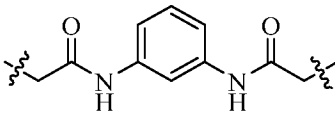
необязательно замещенный  ; в некоторых вариантах реализации, это

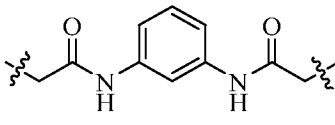
замещенный  ; в некоторых вариантах реализации, это

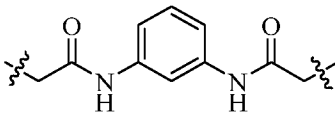
 , где двухвалентное фенильное кольцо является обязательно

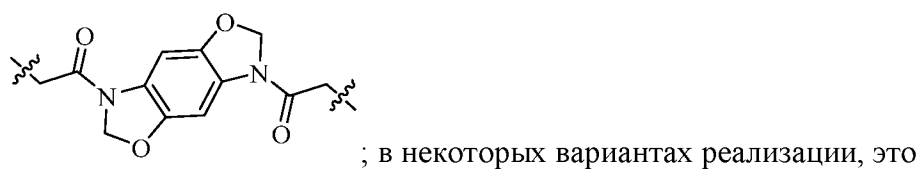
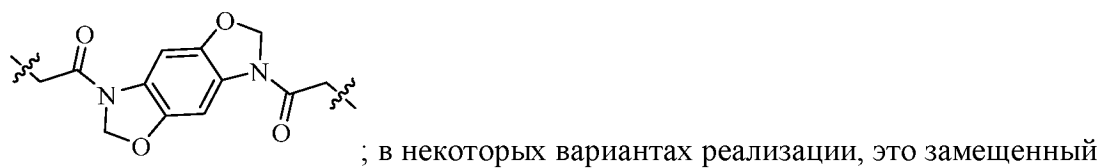
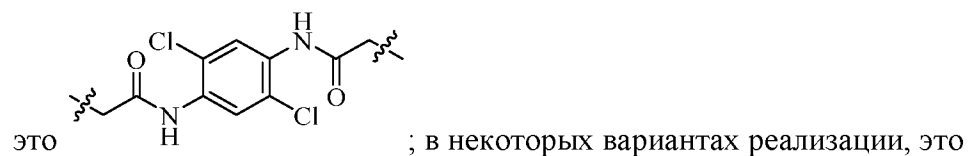
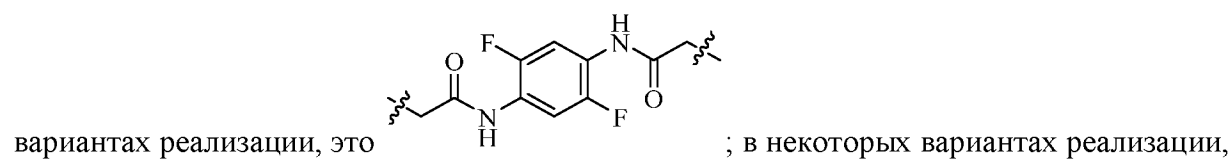
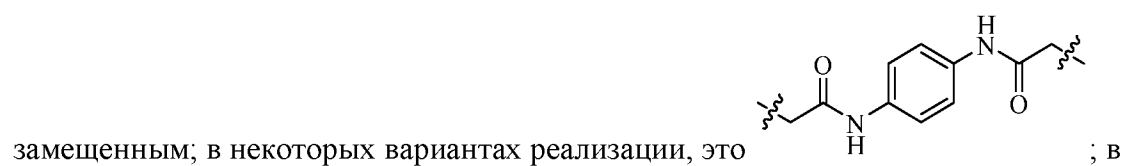
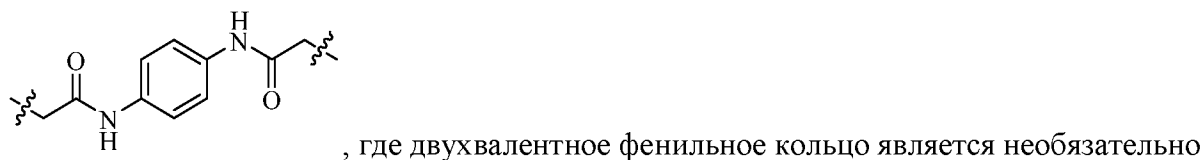
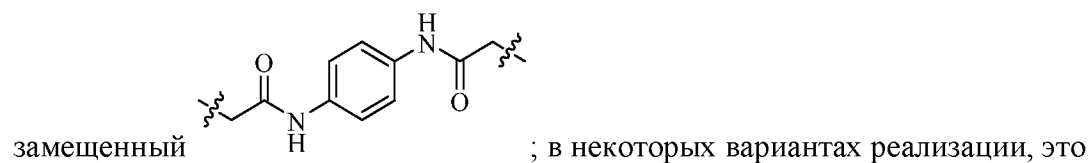
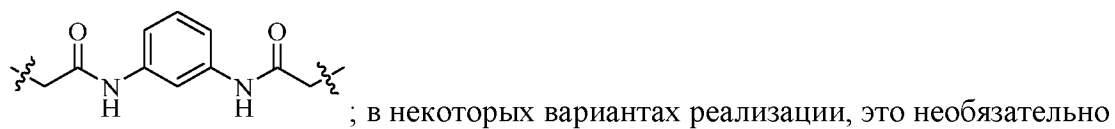
замещенным; в некоторых вариантах реализации, это  ; в некоторых

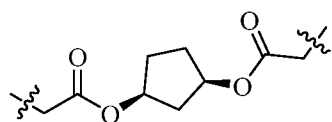
вариантах реализации, это обязательно замещенный  ; в

некоторых вариантах реализации, это  , где двухвалентное фенильное кольцо является обязательно замещенным; в некоторых вариантах

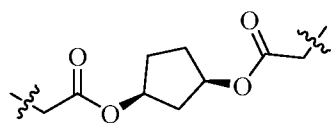
реализации, это не  ; в некоторых вариантах реализации, это

 ; в некоторых вариантах реализации, это замещенный

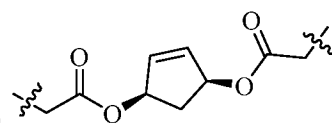




; в некоторых вариантах реализации, это замещенный

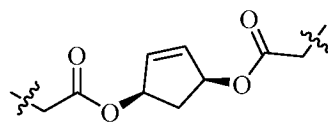


; в некоторых вариантах реализации, это



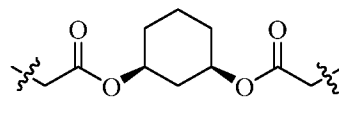
;

в некоторых вариантах реализации, это замещенный



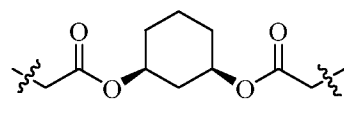
; в

некоторых вариантах реализации, это



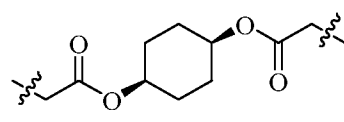
; в некоторых вариантах

реализации, это замещенный



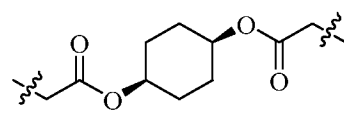
; в некоторых вариантах

реализации, это

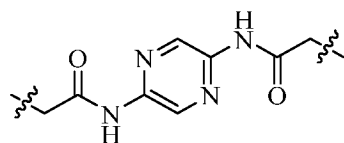


; в некоторых вариантах реализации, это

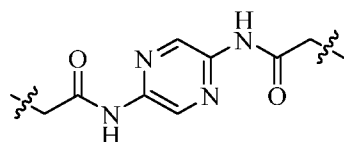
замещенный



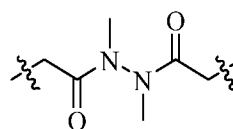
; в некоторых вариантах реализации, это



; в некоторых вариантах реализации, это замещенный

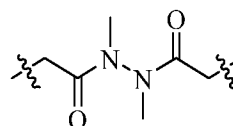


; в некоторых вариантах реализации, это



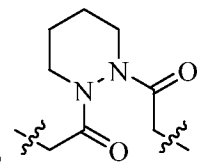
; в

некоторых вариантах реализации, это замещенный



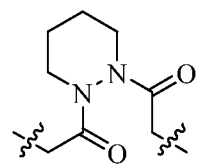
; в некоторых

вариантах реализации, это



; в некоторых вариантах реализации, это

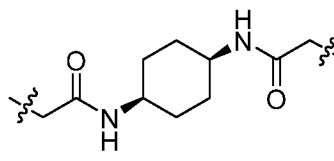
замещенный

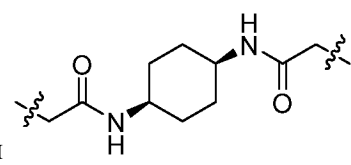


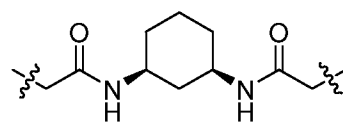
[215] В некоторых вариантах реализации изобретения, соединение выбирают из:

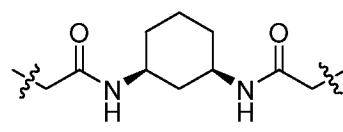
Таблица 3

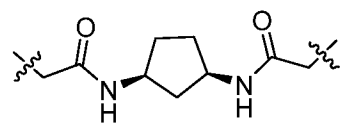
[216] В некоторых вариантах реализации L^s или L^{s2} или $-L^{x1}-C(O)Q-L'-QC(O)-L^{x1}-$ или $-CH_2C(O)Q-L'-QC(O)CH_2-$ содержат необязательно замещенное насыщенное или частично ненасыщенное 3-20 (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20)-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее 0-10 (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) гетероатомов (например, в некоторых вариантах реализации, выбранных из азота, кислорода и сера); в некоторых вариантах реализации они содержат необязательно замещенное 3-20 (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20)-членное циклоалифатическое кольцо; в некоторых

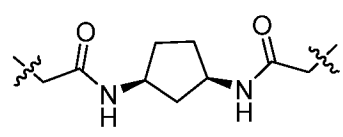
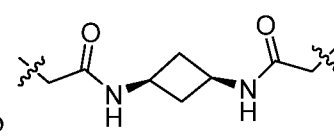
вариантах реализации, это  ; в некоторых вариантах реализации,

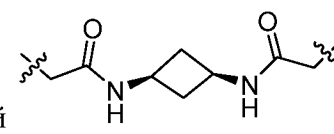
это замещенный  ; в некоторых вариантах реализации, это

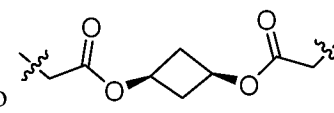
 ; в некоторых вариантах реализации, это замещенный

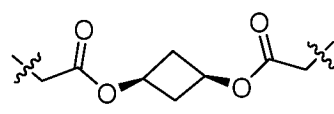
 ; в некоторых вариантах реализации, это

 ; в некоторых вариантах реализации, это замещенный

 ; в некоторых вариантах реализации, это  ;

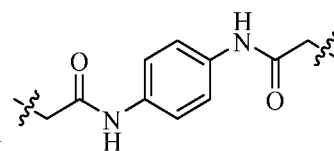
в некоторых вариантах реализации, это замещенный  ; в

некоторых вариантах реализации, это  ; в некоторых вариантах

реализации, это замещенный  ; в некоторых вариантах реализации,

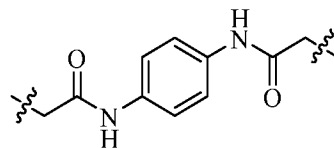
они содержат необязательно замещенное 6-20 (например, 6, 10 или 14)-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое арильное кольцо; в некоторых

вариантах реализации, это необязательно замещенный



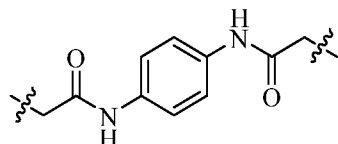
; в

некоторых вариантах реализации, это

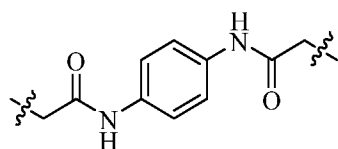


, где фенильное кольцо

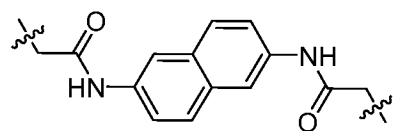
является необязательно замещенным; в некоторых вариантах реализации, это



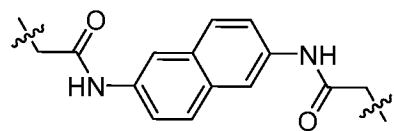
; в некоторых вариантах реализации, это замещенный



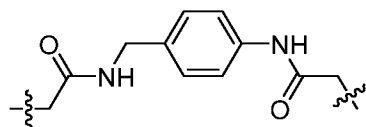
; в некоторых вариантах реализации, это



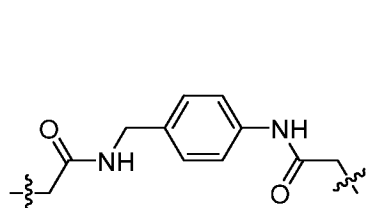
; в некоторых вариантах реализации, это замещенный



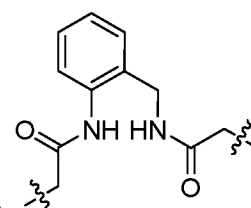
; в некоторых вариантах реализации, это



; в некоторых вариантах реализации, это замещенный

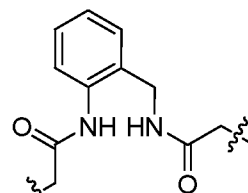


; в некоторых вариантах реализации, это



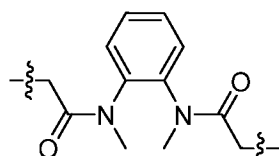
; в

некоторых вариантах реализации, это замещенный

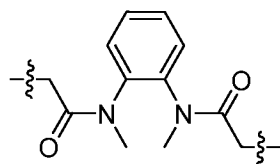


; в некоторых

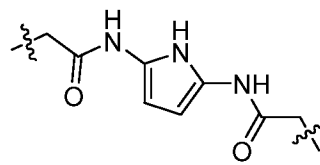
вариантах реализации, это



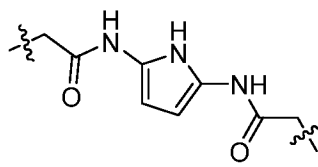
; в некоторых вариантах реализации, это



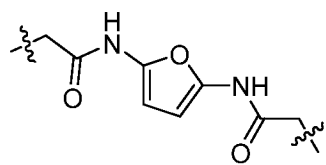
замещенный ; в некоторых вариантах реализации они содержат необязательно замещенное 5-20 (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20)-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое гетероарильное кольцо, содержащее 0-10 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) гетероатомов (например, в некоторых вариантах реализации, выбранных из азота, кислорода и сера); в



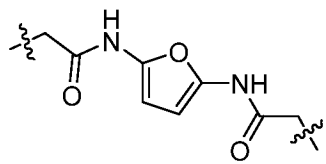
некоторых вариантах реализации, это ; в некоторых вариантах



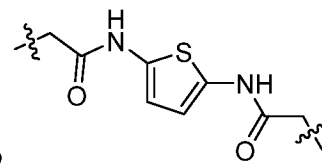
реализации, это замещенный ; в некоторых вариантах реализации,



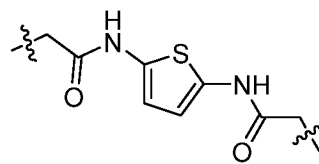
это ; в некоторых вариантах реализации, это замещенный



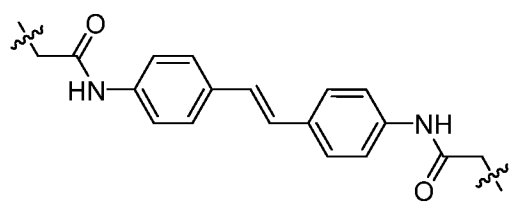
; в некоторых вариантах реализации, это



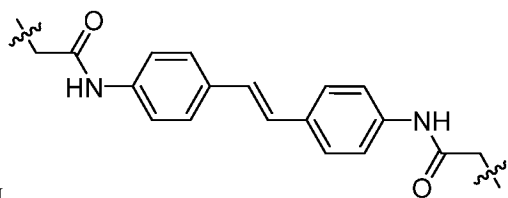
; в



некоторых вариантах реализации, это замещенный ; в некоторых вариантах реализации они содержат два или больше необязательно замещенных кольца, каждое из которых независимо представляет собой 3-10 (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10)-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо или 5-10-членное ароматическое кольцо, каждое из которых независимо содержит 0-10 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) гетероатомов (например, в некоторых вариантах реализации, выбранных из азота, кислорода и серы); в некоторых вариантах реализации, это



; в некоторых вариантах реализации, это



замещенный ; в некоторых вариантах реализации они содержат необязательно замещенное 5-20 (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20)-членное бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее 0-10 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) гетероатомов (например, в некоторых вариантах реализации, выбранных из азота, кислорода и серы), где каждое из моноциклических колец независимо представляет собой 3-10 (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10)-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-10 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) гетероатомов (например, в некоторых вариантах реализации, выбранных из азота, кислорода и серы) или 5-10 (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10)-членное ароматическое кольцо, содержащее 0-10 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) гетероатомов (например, в некоторых вариантах реализации, выбранных из азота,

кислорода и серы); в некоторых вариантах реализации, это ; в

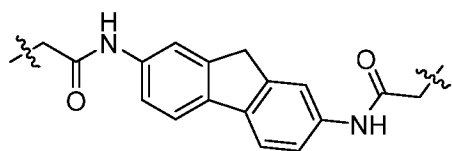
некоторых вариантах реализации, это замещенный ; в

некоторых вариантах реализации, это ; в некоторых вариантах

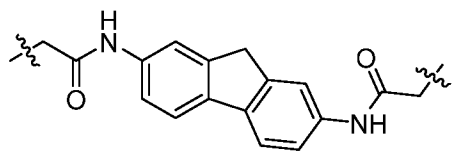
реализации, это замещенный ; в некоторых вариантах реализации, это

; в некоторых вариантах реализации, это замещенный

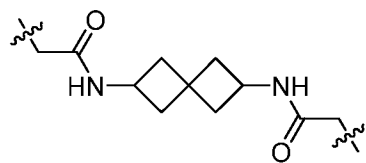
; в некоторых вариантах реализации, это



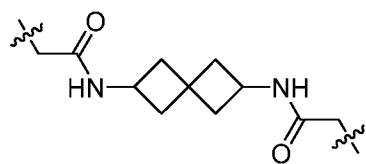
; в некоторых вариантах реализации, это замещенный



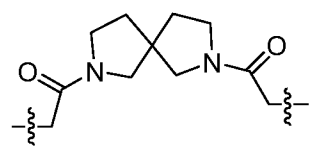
; в некоторых вариантах реализации, это



; в некоторых вариантах реализации, это замещенный

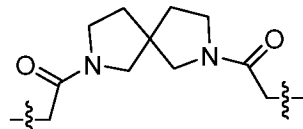


; в некоторых вариантах реализации, это



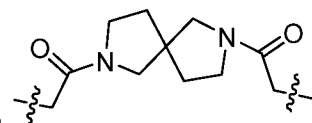
;

в некоторых вариантах реализации, это замещенный



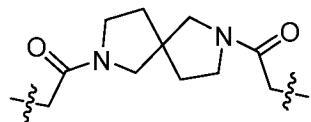
; в некоторых

вариантах реализации, это

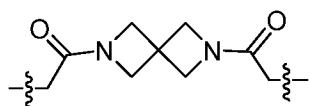


; в некоторых вариантах реализации, это

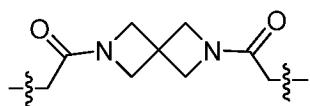
замещенный



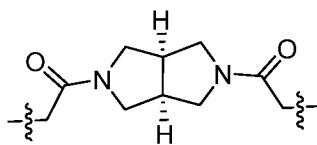
; в некоторых вариантах реализации, это



; в некоторых вариантах реализации, это замещенный

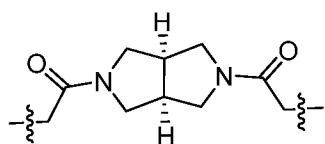


; в некоторых вариантах реализации, это



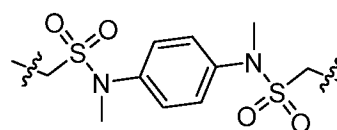
; в

некоторых вариантах реализации, это замещенный



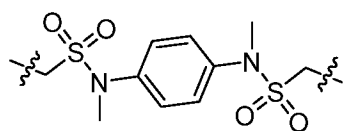
. В некоторых

вариантах реализации, L^s или L^{s2} представляет собой

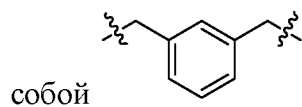


. В

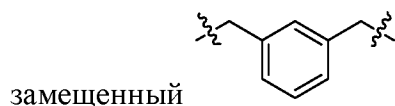
некоторых вариантах реализации, L^s или L^{s2} представляет собой замещенный



. В некоторых вариантах реализации, L^s или L^{s2} представляет



. В некоторых вариантах реализации, L^s или L^{s2} представляет собой



[217] Как описано в данном документе, кольца могут быть разных размеров. В некоторых вариантах реализации неароматические кольца являются 3-20-членными. В некоторых вариантах реализации, ароматические кольца являются 5-20-членными. В некоторых вариантах реализации кольцо является 3-10-членным. В некоторых вариантах реализации кольцо является 3-членным. В некоторых вариантах реализации кольцо является 4-членным. В некоторых вариантах реализации кольцо является 5-членным. В некоторых вариантах реализации кольцо является 6-членным. В некоторых вариантах реализации кольцо является 7-членным. В некоторых вариантах реализации кольцо является 8-членным. В некоторых вариантах реализации кольцо является 9-членным. В некоторых вариантах реализации, кольцо является 10-членным. В некоторых вариантах реализации, кольцо является 11-членным. В некоторых вариантах реализации, кольцо является 12-членным. В некоторых вариантах реализации, кольцо является 13-членным. В некоторых вариантах реализации, кольцо является 14-членным. В некоторых вариантах реализации, кольцо является 15-членным. Кольца также могут содержать различное количество и типы гетероатомов. В некоторых вариантах реализации кольцо содержит 0-10 гетероатомов. В некоторых вариантах реализации, кольцо содержит 0 гетероатомов. В некоторых вариантах реализации, кольцо содержит 1 гетероатом. В некоторых вариантах реализации, кольцо содержит 2 гетероатома. В некоторых вариантах реализации, кольцо содержит 3 гетероатома. В некоторых вариантах реализации, кольцо содержит 4 гетероатома. В некоторых вариантах реализации, кольцо содержит 5 гетероатомов. В некоторых вариантах реализации, кольцо содержит 6 гетероатомов. В некоторых вариантах реализации, кольцо содержит 7 гетероатомов. В некоторых вариантах реализации, кольцо содержит 8 гетероатомов. В некоторых вариантах реализации, кольцо содержит 9 гетероатомов. В некоторых вариантах реализации, кольцо содержит 10 гетероатомов. В некоторых вариантах реализации гетероатом выбирают из азота, кислорода и серы. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один гетероатом представляет собой азот. В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере один гетероатом представляет собой кислород. В некоторых вариантах реализации, по

меньшей мере один гетероатом представляет собой серу. В некоторых вариантах реализации кольцо является насыщенным. В некоторых вариантах реализации кольцо является частично ненасыщенным. В некоторых вариантах реализации кольцо является ароматическим. В некоторых вариантах реализации кольцо представляет собой циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, кольцо представляет собой циклоалкильное кольцо. В некоторых вариантах реализации, кольцо представляет собой гетероалифатическое кольцо. В некоторых вариантах реализации кольцо представляет собой гетероциклическое кольцо. В некоторых вариантах реализации, кольцо представляет собой гетероциклоалкильное кольцо. В некоторых вариантах реализации кольцо представляет собой арильное кольцо. В некоторых вариантах реализации, кольцо представляет собой гетероарильное кольцо. Специалистам в данной области понятно, что кольца являются независимо и необязательно замещенными - либо замещенными, либо незамещенными.

[218] Многие дополнительные технологии полезны для получения сшитых пептидов в соответствии с данным изобретением. Например, в некоторых вариантах реализации аминокислотные остатки, имеющие боковые цепи, содержащие двойные или тройные связи и, необязательно, различные гетероатомы, могут применяться для конструирования различных типов сшивок, например, углеводородных сшивок, аминокислотных сшивок или карбаматсодержащих сшивок и т.д.

[219] Специалистам в данной области техники будет понятно, что после сшивания с применением описанных в данном документе реагентов части структур реагентов будут включаться в сшивки в продуктах. Таким образом, различные варианты реализации L^s , L^{s2} , $-L^{x1}-C(O)Q-L'-QC(O)-L^{x1}-$, $-CH_2C(O)Q-L'-QC(O)CH_2-$, L^{x1} , Q , L' и т.д., описанные для реагентов, могут применяться в сшивках, и наоборот.

Сшитые пептиды

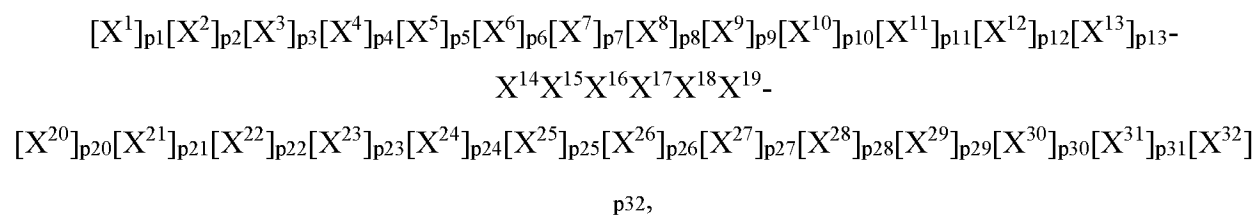
[220] Сшитые пептиды, как описано в данном документе, представляют собой пептиды, в которых две или больше аминокислоты пептидной цепи соединены посредством связывания двух атомов аминокислотных остатков пептидной основной цепи и, как понятно специалистам в данной области, в образующейся в результате связи не участвует пептидная основная цепь между связанными аминокислотными остатками. В некоторых вариантах реализации сшитый пептид содержит сшивку. Сшивка, как описано в данном документе, представляет собой линкер, который может связывать один аминокислотный остаток с другим аминокислотным остатком посредством связывания двух атомов аминокислотных остатков пептидной основной цепи и, как понятно

специалистам в данной области, в образующейся в результате связи не участвует пептидная основная цепь между связанными аминокислотными остатками. В некоторых вариантах реализации сшивка связывается с основной цепью пептида путем замены одного или нескольких атомов водорода и/или заместителей (например, боковых цепей, О, S и т.д.) на атомах основной цепи пептида (например, С, N и т.д.).

[221] Специалистам в данной области будет понятно, что доступны различные технологии сшивания пептидов, включая технологии как углеводородного сшивания, так и неуглеводородного сшивания.

[222] В некоторых вариантах реализации описанная в данном документе сшивка представляет собой углеводородную сшивку. В некоторых вариантах реализации, сшивка, как описано в данном документе, представляет собой неуглеводородную сшивку. В некоторых вариантах реализации неуглеводородная сшивка содержит один или несколько гетероатомов цепи, причем цепь сшивки представляет собой кратчайшее ковалентное соединение внутри сшивки от одного конца сшивки до другого конца сшивки. В некоторых вариантах реализации неуглеводородная сшивка содержит по меньшей мере один атом серы, полученный из аминокислотного остатка полипептида. В некоторых вариантах реализации неуглеводородная сшивка содержит два атома серы, полученных из двух разных аминокислотных остатков полипептида. В некоторых вариантах реализации, неуглеводородная сшивка содержит два атома серы, полученных из двух разных аминокислотных остатков цистеина полипептида. В некоторых вариантах реализации сшивка представляет собой сшивку цистеинами. В некоторых вариантах реализации, сшивка представляет собой нецистеиновую сшивку.

[223] В некоторых вариантах реализации данного изобретения предлагается сшитый пептид, имеющий структуру:



где:

каждый из p1, p2, p3, p4, p5, p6, p7, p8, p9, p10, p11, p12, p13, p20, p21, p22, p23, p24, p25, p26, p27, p28, p29, p30, p31, p32 независимо равен 0 или 1;

каждый из X^1 - X^{32} независимо представляет собой аминокислотный остаток;

по меньшей мере два из X^1 - X^{32} содержат боковые цепи, которые необязательно связаны друг с другом с образованием сшивки.

[224] В некоторых вариантах реализации предложенный пептид представляет собой

сшитый пептид, и по меньшей мере два из X^1-X^{32} содержат боковые цепи, которые связаны вместе с образованием сшивки. В некоторых вариантах реализации, предложенный пептид представляет собой несшитый пептид, причем по меньшей мере два из X^1-X^{32} содержат боковые цепи, которые могут быть связаны вместе с образованием сшивки. В некоторых вариантах реализации сшитый пептид или несшитый пептид после сшивания взаимодействует с мишенью, представляющей интерес, по одному или нескольким сайтам мишени, представляющей интерес.

[225] В некоторых вариантах реализации каждый из X^1-X^{32} независимо представляет собой аминокислотный остаток аминокислоты, имеющей структуру формулы A-I.

[226] В некоторых вариантах реализации X^i и X^{i+m} каждый независимо содержат боковую цепь, содержащую тиол, и две боковые цепи могут быть связаны вместе с образованием сшивки. В некоторых вариантах реализации, X^i и X^{i+m} , каждый независимо содержат боковую цепь цистеина, и две боковые цепи могут быть связаны вместе с образованием цистеиновой сшивки.

[227] В некоторых вариантах реализации X^i и X^{i+m} каждый независимо содержат боковую цепь, содержащую олефин. В некоторых вариантах реализации оба олефина представляют собой олефины с концевыми двойными связями. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один из X^i и X^{i+m} содержит боковую цепь, содержащую олефин и атом азота. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один из X^i и X^{i+m} содержит $-C(R^{2a})(R^{3a})$, являющийся $-C(-L^a-R')(R^{3a})$, причем по меньшей мере одно метиленовое звено L^a заменено на $-N(R')-$ и R' содержит олефин. В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере один из X^i и X^{i+m} содержит $-C(R^{2a})(R^{3a})$, являющийся $-C(-L^a-CH=CH_2)(R^{3a})$, причем по меньшей мере одно метиленовое звено L^a заменено на $-N(R')-$.

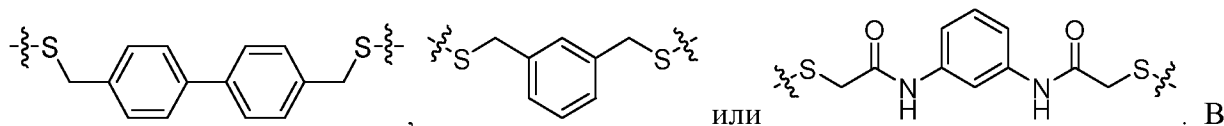
[228] В некоторых вариантах реализации i является целым числом от 1 до 31 включительно, а m - целым числом от 1 до 12 включительно.

[229] В некоторых вариантах реализации, i равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31. В некоторых вариантах реализации, i равно 1. В некоторых вариантах реализации, i равно 2. В некоторых вариантах реализации, i равно 3. В некоторых вариантах реализации, i равно 4. В некоторых вариантах реализации, i равно 5. В некоторых вариантах реализации, i равно 6. В некоторых вариантах реализации, i равно 7. В некоторых вариантах реализации, i равно 8. В некоторых вариантах реализации, i равно 9. В некоторых вариантах реализации, i равно 10. В некоторых вариантах реализации, i равно 11. В некоторых вариантах

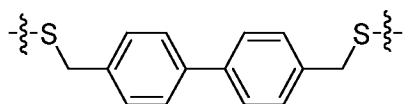
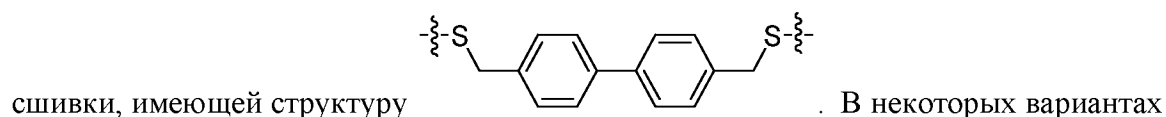
реализации, i равно 12. В некоторых вариантах реализации, i равно 13. В некоторых вариантах реализации, i равно 14. В некоторых вариантах реализации, i равно 15. В некоторых вариантах реализации, i равно 16. В некоторых вариантах реализации, i равно 17. В некоторых вариантах реализации, i равно 18. В некоторых вариантах реализации, i равно 17. В некоторых вариантах реализации, i равно 18. В некоторых вариантах реализации, i равно 19. В некоторых вариантах реализации, i равно 20. В некоторых вариантах реализации, i равно 21. В некоторых вариантах реализации, i равно 22. В некоторых вариантах реализации, i равно 23. В некоторых вариантах реализации, i равно 24. В некоторых вариантах реализации, i равно 25. В некоторых вариантах реализации, i равно 26. В некоторых вариантах реализации, i равно 27. В некоторых вариантах реализации, i равно 28. В некоторых вариантах реализации, i равно 29. В некоторых вариантах реализации, i равно 30. В некоторых вариантах реализации, i равно 31. В некоторых вариантах реализации, i равно 32.

[230] В некоторых вариантах реализации, m равно 1. В некоторых вариантах реализации, m равно 2. В некоторых вариантах реализации, m равно 3. В некоторых вариантах реализации, m равно 4. В некоторых вариантах реализации, m равно 5. В некоторых вариантах реализации, m равно 6. В некоторых вариантах реализации, m равно 7. В некоторых вариантах реализации, m равно 8. В некоторых вариантах реализации, m равно 9. В некоторых вариантах реализации, m равно 10. В некоторых вариантах реализации, m равно 11. В некоторых вариантах реализации, m равно 12.

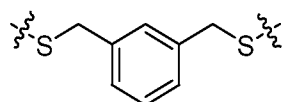
[231] В некоторых вариантах реализации сшитый пептид содержит одну или несколько сшивок. В некоторых вариантах реализации сшитый пептид содержит одну и не более одной сшивки. В некоторых вариантах реализации, сшитый пептид содержит одну и не более одной сшивки из цистеиновой сшивки. В некоторых вариантах реализации сшитый пептид содержит одну и не более одной сшивки, имеющей структуру



некоторых вариантах реализации, сшитый пептид содержит одну и не более одной

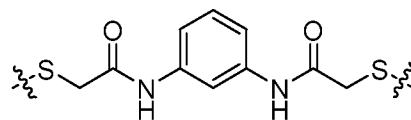


сшивки, имеющей структуру . В некоторых вариантах реализации, сшитый пептид содержит одну и не более одной сшивки, имеющей структуру



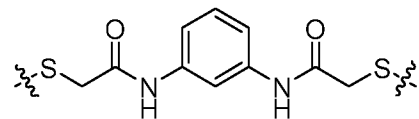
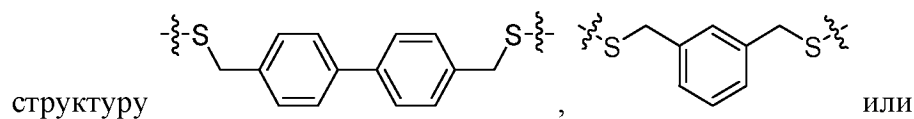
. В некоторых вариантах реализации, сшитый пептид содержит одну

и не более одной сшивки, имеющей структуру

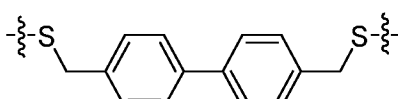


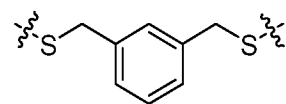
. В

некоторых вариантах реализации, сшитый пептид не содержит сшивки, имеющей

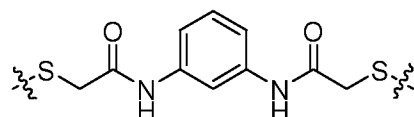


. В некоторых вариантах реализации, сшитый пептид не

содержит сшивки, имеющей структуру . В некоторых вариантах реализации, сшитый пептид не содержит сшивки, имеющей структуру



. В некоторых вариантах реализации, сшитый пептид не содержит

сшивки, имеющей структуру .

[232] В некоторых вариантах реализации пептиды, например, сшитые пептиды по данному изобретению, имеют или содержат спиральную структуру. Специалистам в данной области техники будет понятно, что спирали могут иметь разную длину. В некоторых вариантах реализации длина спиралей составляет от 5 до 30 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации, длина спиралей составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или больше аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации, длина спиралей составляет 6 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации, длина спиралей составляет 8 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации, длина спиралей составляет 10 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации, длина спиралей составляет 12 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации, длина спиралей составляет 14 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации, длина спиралей составляет 16 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации, длина спиралей составляет 17 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации, длина спиралей составляет 18 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации, длина спиралей составляет 19 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации, длина спиралей составляет 20 аминокислотных остатков.

Цистеиновые сшивки

[233] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает полезные технологии, относящиеся к сшиванию цистеинами. Помимо прочего, данное изобретение предусматривает, что пептиды, пригодные для сшивания цистеинами, и/или содержащие одну или несколько цистеиновых сшивок, могут быть получены и/или оцениваться в биологической системе. Данное изобретение также предусматривает, что некоторые такие системы позволяют обеспечить разработку, производство и/или оценку сшитых цистеином пептидов, имеющих ряд различных структур (например, различные аминокислотные последовательности), и фактически могут предоставить пользователю полный контроль над выбором и реализацией аминокислотных последовательностей для включения в сшитые пептиды.

[234] Сшивание цистеинами, как описано в данном документе, включает связывание одного остатка цистеина с другим остатком цистеина, при этом образующаяся связь не проходит через пептидную основную цепь между связанными остатками цистеина.

[235] В некоторых вариантах реализации описанный в данном документе сшитый пептид содержит сшивку, которая представляет собой сшивку L^s , где:

L^s представляет собой $-L^{s1}-S-L^{s2}-S-L^{s3}-$;

L^{s1} и L^{s3} каждый независимо представляют собой L ;

L^{s2} представляет собой L и содержит по меньшей мере один $-C(O)-$; и

каждый L независимо представляет собой ковалентную связь или необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_{25} алифатическую группу, причем одно или несколько метиленовых звеньев алифатической группы необязательно и независимо замещены на $-C(R')_2-$, $-Cy-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')-$, $-C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$, $-C(O)S-$ или $-C(O)O-$;

каждый $-Cy-$ независимо представляет собой необязательно замещенную двухвалентную группу, выбранную из C_{3-20} циклоалифатического кольца, C_{6-20} арильного кольца, 5-20-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3-20-членного гетероциклического кольца, содержащего 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния;

каждый R' независимо представляет собой $-R$, $-C(O)R$, $-CO_2R$ или $-SO_2R$;

каждый R независимо представляет собой $-H$ или необязательно замещенную группу,

выбранную из C_{1-30} алифатической, C_{1-30} гетероалифатической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, C_{6-30} арильной, C_{6-30} арилалифатической, C_{6-30} арилгетероалифатической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, 5-30-членной гетероарильной, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3-30-членной гетероциклической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, или

две группы R, необязательно и независимо, вместе образуют ковалентную связь; или две или более групп R на одном и том же атоме, необязательно и независимо, вместе с указанным атомом образуют необязательно замещенное 3-30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее, помимо указанного атома, 0-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния; или две или более групп R на двух или нескольких атомах, необязательно и независимо, вместе с промежуточными атомами между ними, образуют необязательно замещенное 3-30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее, в дополнение к промежуточным атомам, 0-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния.

[236] В некоторых вариантах реализации L независимо представляет собой двухвалентную C_1-C_{25} алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L независимо представляет собой двухвалентную C_1-C_{20} алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L независимо представляет собой двухвалентную C_1-C_{10} алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L независимо представляет собой двухвалентную C_1-C_5 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L независимо представляет собой двухвалентную C_1 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой $-CH_2-$.

[237] В некоторых вариантах реализации, L^{s1} представляет собой $-CH_2-$. В некоторых вариантах реализации, L^{s3} представляет собой $-CH_2-$. В некоторых вариантах реализации L^{s1} и L^{s3} оба представляют собой $-CH_2-$. В некоторых вариантах реализации L^s представляет собой $-CH_2-S-L^{s2}-S-CH_2-$.

[238] В некоторых вариантах реализации L^{s2} содержит $-C(R')_2-L'-C(R')_2-$, где L' описан в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой $-L^{x1}-C(O)Q-L'-QC(O)-L^{x1}-$, где каждая переменная независимо имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой $-CH_2C(O)Q-L'-QC(O)CH_2-$, где каждая $-CH_2-$ независимо и необязательно

является замещенной. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Q}-\text{L}'-\text{QC}(\text{O})\text{CH}_2-$.

[239] В некоторых вариантах реализации L^{s2} представляет собой L и содержит по меньшей мере один $-\text{C}(\text{O})-$. В некоторых вариантах реализации L^{s2} представляет собой L и содержит по меньшей мере два $-\text{C}(\text{O})-$. В некоторых вариантах реализации L^{s2} представляет собой L и содержит по меньшей мере один $-\text{C}(\text{O})\text{Q}-$, где Q выбирают из группы, состоящей из ковалентной связи, $-\text{N}(\text{R}')$ -, $-\text{O}-$ и $-\text{S}-$. В некоторых вариантах реализации L^{s2} представляет собой L и содержит по меньшей мере один $-\text{C}(\text{O})\text{Q}-$, где Q выбирают из $-\text{N}(\text{R}')$ - и $-\text{O}-$. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой L и содержит по меньшей мере два $-\text{C}(\text{O})\text{Q}-$, где Q независимо выбирают из группы, состоящей из: $-\text{N}(\text{R}')$ -, $-\text{O}-$, и $-\text{S}-$. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой L и содержит по меньшей мере два $-\text{C}(\text{O})\text{Q}-$, где Q выбирают из $-\text{N}(\text{R}')$ - и $-\text{O}-$. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой L и содержит по меньшей мере один $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')$ -. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой L и содержит по меньшей мере два $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')$ -. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой L и содержит по меньшей мере один $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой L и содержит по меньшей мере два $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$.

[240] В некоторых вариантах реализации L^{s2} содержит $-\text{Q}-\text{L}'-\text{Q}-$, где Q независимо выбирают из группы, состоящей из: $-\text{N}(\text{R}')$ -, $-\text{O}-$ и $-\text{S}$, где L' описан в данном изобретении.

[241] В некоторых вариантах реализации, L^{s2} содержит $-\text{Q}-\text{L}'-\text{Q}-$, где Q независимо выбирают из $-\text{N}(\text{R}')$ - и $-\text{O}-$, и L' описан в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} содержит $-\text{C}(\text{O})\text{Q}-\text{L}'-\text{QC}(\text{O})-$, где Q независимо выбирают из группы, состоящей из: $-\text{N}(\text{R}')$ -, $-\text{O}-$ и $-\text{S}$, и L' описан в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} содержит $-\text{C}(\text{O})\text{Q}-\text{L}'-\text{QC}(\text{O})-$, где Q независимо выбирают из $-\text{N}(\text{R}')$ - и $-\text{O}$, и L' описан в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} содержит $-\text{C}(\text{R}')_2\text{C}(\text{O})\text{Q}-\text{L}'-\text{QC}(\text{O})\text{C}(\text{R}')_2-$, где Q независимо выбирают из группы, состоящей из: $-\text{N}(\text{R}')$ -, $-\text{O}-$ и $-\text{S}$, и L' описан в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} содержит $-\text{C}(\text{R}')_2\text{C}(\text{O})\text{Q}-\text{L}'-\text{QC}(\text{O})\text{C}(\text{R}')_2-$, где Q независимо выбирают из $-\text{N}(\text{R}')$ - и $-\text{O}$, и L' описан в данном изобретении.

[242] В некоторых вариантах реализации, L^{s2} содержит $-\text{N}(\text{R}')$ - L' - $\text{N}(\text{R}')$ -, где L' описан в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} содержит $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')$ - L' - $\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})-$, где L' описан в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой $-\text{C}(\text{R}')_2\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')$ - L' - $\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{R}')_2-$, где L'

описан в данном изобретении.

[243] В некоторых вариантах реализации, L^{s2} содержит $-O(R')-L'-O(R')-$, где L' описан в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} содержит $-C(O)O-L'-OC(O)-$, где L' описан в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой $-C(R')_2C(O)O-L'-OC(O)C(R')_2-$, где L' описан в данном изобретении.

[244] В некоторых вариантах реализации R' представляет собой необязательно замещенную C₁₋₃₀ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, R' представляет собой необязательно замещенную C₁₋₁₅ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, R' представляет собой необязательно замещенную C₁₋₁₀ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, R' представляет собой необязательно замещенную C₁₋₅ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации R' представляет собой водород.

[illegible]

реализации, L' представляет собой $-(\text{CH}_2)_7-$. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой $-(\text{CH}_2)_8-$.

[illegible]

[247] В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентное 5-20-членное гетероарильное кольцо, содержащее 1-10 гетероатомов, независимо

выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентное 5-6-членное гетероарильное кольцо, содержащее 1-4 гетероатома, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентное 5-6-членное гетероарильное кольцо, содержащее 1-4 гетероатома, независимо выбранных из кислорода, азота и серы. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой двухвалентное 6-членное гетероарильное кольцо, содержащее 1-2 гетероатома, независимо выбранных из кислорода, азота и серы. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой двухвалентное 6-членное гетероарильное кольцо, содержащее 2 атома азота.

[illegible]

циклоалкильное кольцо.

[249] В некоторых вариантах реализации, L^{s2} содержит $-N(R')-L'-N(R')-$, и L' представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах реализации L^{s2} содержит $-N(R)-N(R)-$, где:

каждый R независимо представляет собой $-H$ или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-30} алифатической, C_{1-30} гетероалифатической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, C_{6-30} арильной, C_{6-30} арилалифатической, C_{6-30} арилгетероалифатической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, 5-30-членной гетероарильной, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3-30-членной гетероциклической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, или

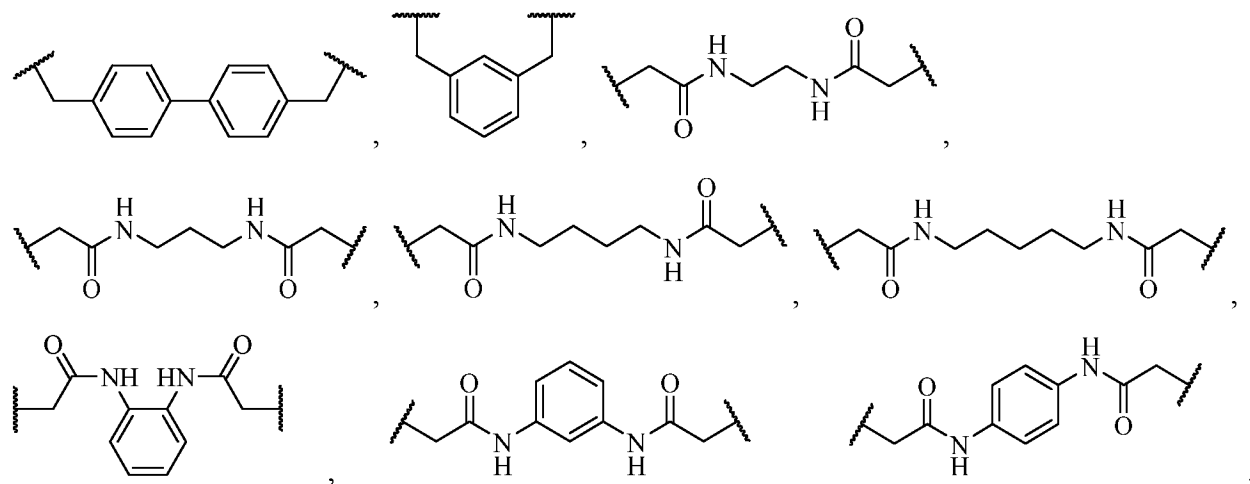
две или более групп R на двух или нескольких атомах, необязательно и независимо, вместе с промежуточными атомами между ними, образуют необязательно замещенное 3-30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее, в дополнение к промежуточным атомам, 0-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния.

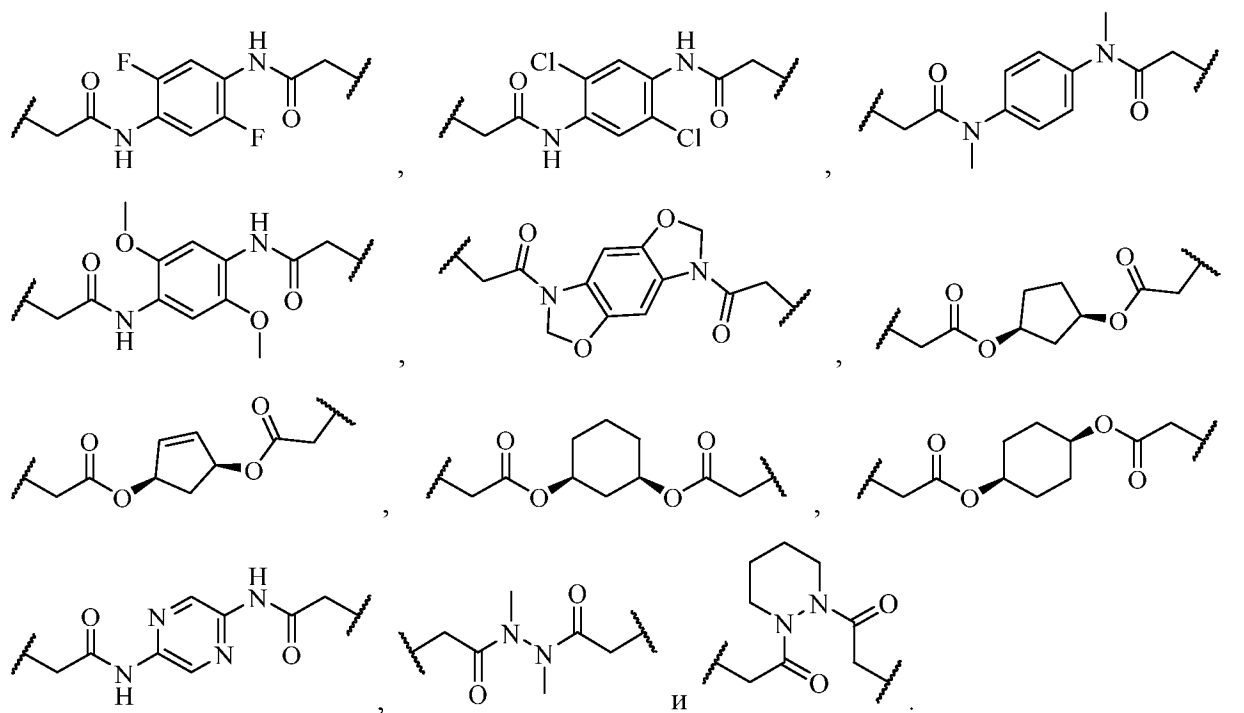
[250] В некоторых вариантах реализации L^{s2} содержит $-N(R)-N(R)-$, где:

каждый R независимо представляет собой необязательно замещенную C_{1-30} алифатическую группу; или

две или более групп R на двух или более атомах, необязательно и независимо, вместе с промежуточными атомами между ними, образуют необязательно замещенное 3-30-членное моноциклическое кольцо.

[251] В некоторых вариантах реализации L^{s2} представляет собой сшивку, выбранную из группы, состоящей из:





[252] Как будет понятно специалистам в данной области, предложенные технологии могут применяться для получения коллекции пептидов с применением нецистеиновых остатков и подходящей для них химии. Например, в некоторых вариантах реализации сшивание цистеинами заменяют на сшивание лизинами, при этом остатки цистеина для сшивания цистеинами заменяют на остатки лизина для сшивания лизинами (например, с применением агентов, которые могут сшивать два остатка лизина, например, посредством реакций с аминогруппами с боковыми цепями). В некоторых вариантах реализации для сшивания лизина R^E в различных формулах представляет собой или содержит группу активированной карбоновой кислоты (например, группу сложного эфира NHS), группу сложного имидоэфира и т.д. Подходящие реагенты широко известны в данной области, многие из них являются коммерчески доступными. В некоторых вариантах реализации сшивание цистеином заменяют сшиванием метионинами. В некоторых вариантах реализации остатки цистеина для сшивания цистеинами заменяют остатками метионина для сшивания метионинами. В некоторых вариантах реализации сшивание цистеинами заменяют сшиванием триптофанами. В некоторых вариантах реализации остатки цистеина для сшивания цистеинами заменяют остатками триптофана для сшивания триптофанами. Специалистам в данной области техники будет понятно, что в данной области описаны различные технологии (например, реагенты, реакции и т.д.), которые могут применяться в соответствии с данным изобретением, например, для сшивания метионинами, сшивания триптофанами и т.д. В некоторых вариантах реализации такое сшивание может быть осуществлено с применением реагентов, имеющих различные формулы, описанные в данном документе, где R^E представляет собой

или содержит группу, подходящую для сшивания метионинами и/или триптофанами. В некоторых вариантах реализации сшивание может быть осуществлено с применением одного остатка в первом положении и другого остатка во втором положении. Подходящие реагенты для такого сшивания могут содержать первую реакционноспособную группу для сшивания в первом положении (например, с помощью первого R^E) и вторую реакционноспособную группу для сшивания во втором положении (например, с помощью второго R^E).

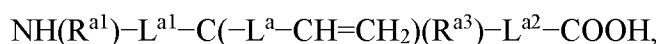
[253] В некоторых вариантах реализации для различных типов сшивания (например, сшивания цистеинами или нецистеинового сшивания) сшивание происходит между остатками (например, остатками цистеина для сшивания цистеинами), разделенными двумя остатками (i+3-сшивание). В некоторых вариантах реализации сшивание происходит между остатками, разделенными тремя остатками (i+4 сшивание). В некоторых вариантах реализации, сшивание происходит между остатками, разделенными шестью остатками (i+7 сшивание).

[254] Специалистам в данной области понятно, что в некоторых вариантах реализации можно одновременно сшивать более двух остатков. Например, в некоторых вариантах реализации три или более цистеина сшивают с применением сшивающих реагентов, содержащих три или более реакционноспособных групп (например, групп R^E).

Нецистеиновое сшивание

[255] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает полезные технологии, относящиеся к нецистеиновому сшиванию. Помимо прочего, данное изобретение предусматривает, что в пептидах, поддающихся сшиванию цистеинами, и/или содержащих одну или несколько нецистеиновых сшивок, остатки цистеина и цистеиновые сшивки могут быть заменены другими аминокислотами и сшивками (например, углеводородными и другими неуглеводородными аминокислотами и сшивками). В некоторых вариантах реализации полученный пептид с нецистеиновой сшивкой сохраняет такое же или схожее взаимодействие с представляющей интерес мишенью по сравнению с эталонным пептидом, сшитым цистеинами. В данном документе описаны нецистеиновые аминокислоты и нецистеиновые сшивки, включающие такие нецистеиновые аминокислотные остатки.

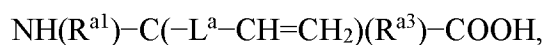
[256] В некоторых вариантах реализации, аминокислота формулы A-I представляет собой соединение, имеющее структуру формулы A-II:



A-II

или его соль, где каждая переменная независимо имеет значения, описанные в данном изобретении.

[257] В некоторых вариантах реализации, аминокислота формулы A-I представляет собой соединение, имеющее структуру формулы **A-III**:



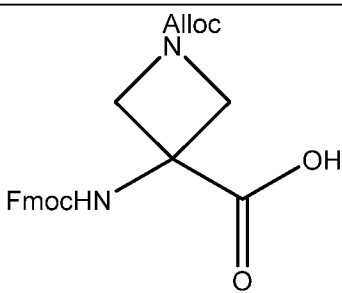
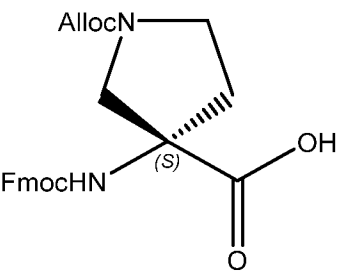
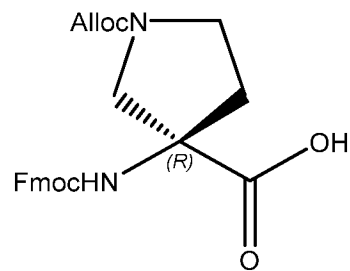
A-III

или его соль, где каждая переменная независимо имеет значения, описанные в данном изобретении.

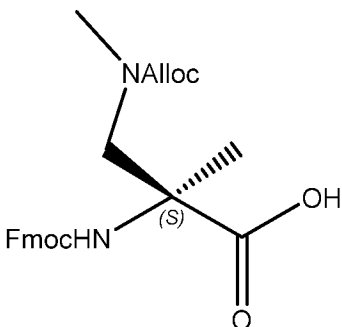
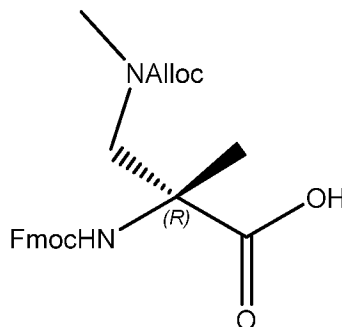
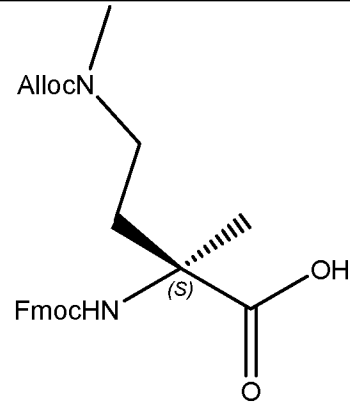
[258] В некоторых вариантах реализации L^{a} содержит по меньшей мере один $-\text{N}(\text{R}')-$, где R' независимо имеет значения, описанные в данном изобретении.

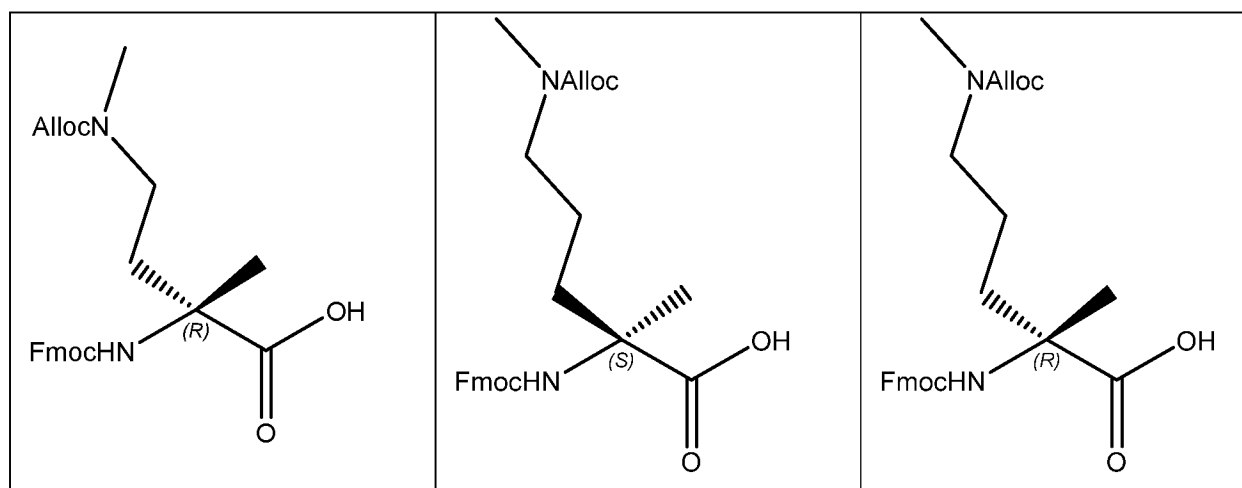
[259] В некоторых вариантах реализации аминокислота формулы A-I представляет собой стандартную аминокислоту. В некоторых вариантах реализации аминокислоту формулы **A-I** выбирают из таблиц A-I, A-II и A-III:

[260] Таблица A-I Примеры аминокислот (Fmoc-защищенные)

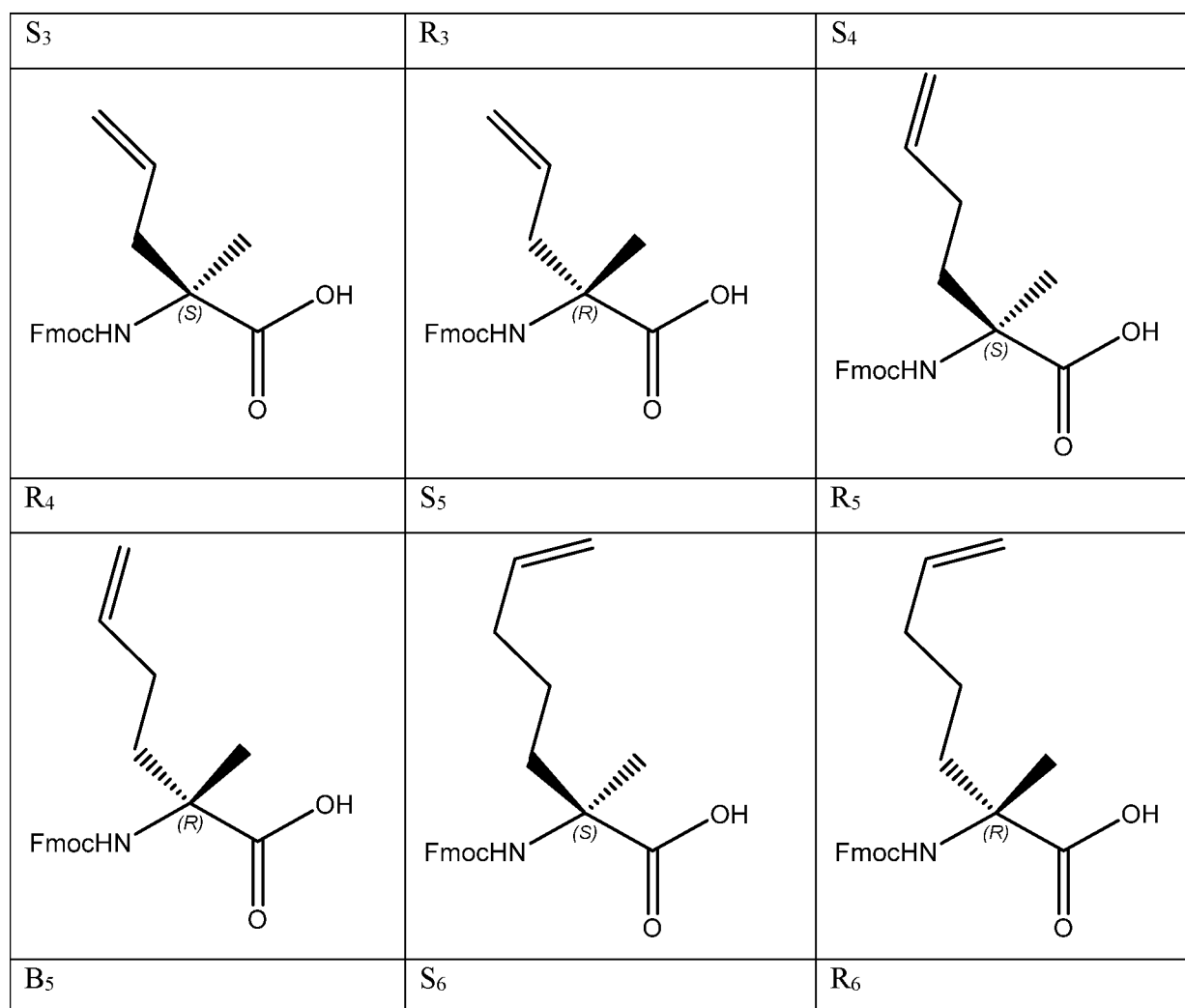
Мономер A (M_A)	Мономер B (M_B)	Мономер C (M_C)
		

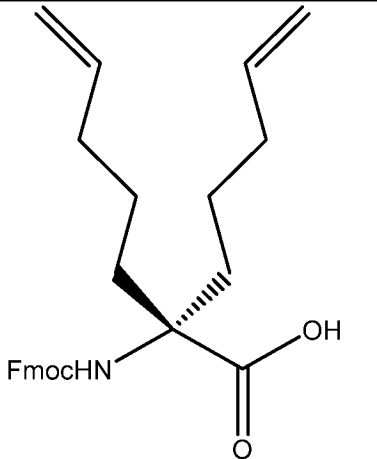
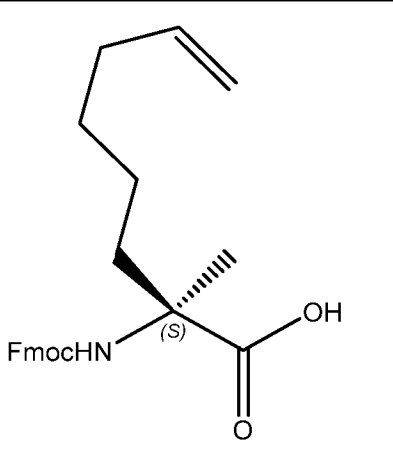
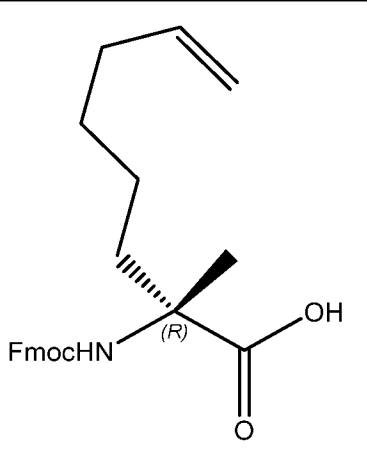
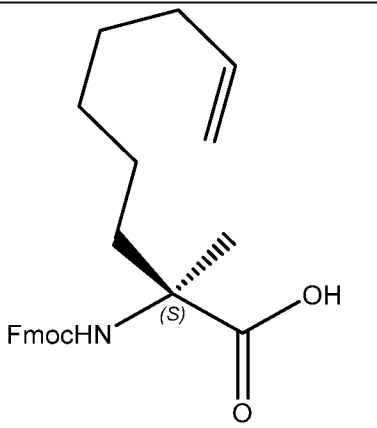
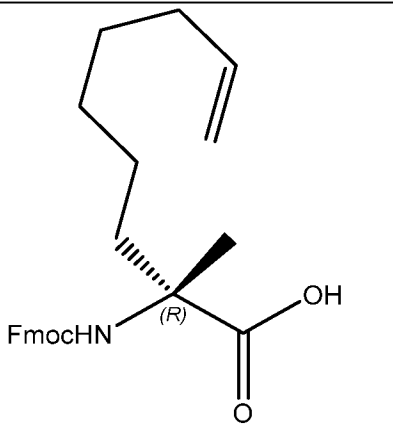
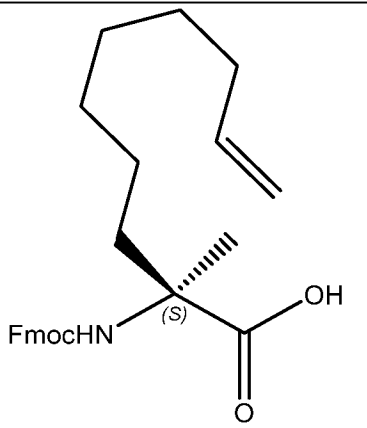
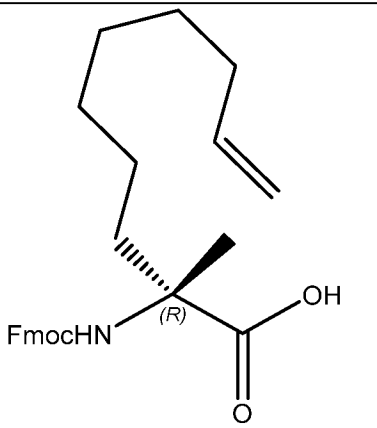
[261] Таблица A-II Примеры аминокислот (Fmoc-защищенные)

Мономер D (M_D)	Мономер E (M_E)	Мономер F (M_F)
		
Мономер G (M_G)	Мономер H (M_H)	Мономер I (M_I)



[262] Таблица А-III Примеры аминокислот (Fmoc-защищенные)



		
S ₇	R ₇	S ₈
		
R ₈		
		

[263] В некоторых вариантах реализации аминокислота представляет собой альфа-аминокислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота представляет собой L-аминокислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота представляет собой D-аминокислоту. В некоторых вариантах реализации альфа-углерод аминокислоты является ахиральным. В некоторых вариантах реализации аминокислота представляет собой бета-аминокислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота представляет собой гамма-аминокислоту.

[264] В некоторых вариантах реализации предложенная аминокислотная последовательность содержит два или более аминокислотных остатка, боковые цепи которых связаны вместе с образованием одной или нескольких сшивок. В некоторых вариантах реализации предложенная аминокислотная последовательность содержит два или более аминокислотных остатка, каждый из которых независимо имеет боковую цепь, содержащую олефин. В некоторых вариантах реализации, предложенная аминокислотная последовательность содержит два или больше аминокислотных остатка, каждый из которых независимо имеет боковую цепь, содержащую терминальный олефин. В некоторых вариантах реализации, предложенная аминокислотная последовательность содержит два и не более двух аминокислотных остатков, каждый из которых независимо имеет боковую цепь, содержащую олефин. В некоторых вариантах реализации, предложенная аминокислотная последовательность содержит два и не более двух аминокислотных остатков, каждый из которых независимо имеет боковую цепь, содержащую терминальный олефин. В некоторых вариантах реализации предложенная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, которая содержит олефин и атом азота, отличный от атома азота его аминокислотной группы. В некоторых вариантах реализации, предложенная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, который содержит терминальный олефин и атом азота, отличный от атома азота его аминокислотной группы. В некоторых вариантах реализации предложенная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, который имеет боковую цепь, содержащую терминальный олефин и атом азота. В некоторых вариантах реализации предложенная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток формулы A-I, где R^{a2} содержит олефин и фрагмент $-N(R')-$, где R' имеет значения, описанные в данном изобретении (включая, в некоторых вариантах реализации, необязательное взятие его вместе с R^{a3} и промежуточными атомами между ними с образованием необязательно замещенного кольца, как описано в данном изобретении). В некоторых вариантах реализации R^{a2} содержит терминальный олефин и фрагмент $-N(R')-$, где R' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации предложенная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере один остаток аминокислоты, выбранной из Таблицы A-I. В некоторых вариантах реализации, предложенная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере один остаток аминокислоты, выбранной из Таблицы A-II. В некоторых вариантах реализации, предложенная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере один остаток аминокислоты, выбранной из Таблицы A-III. В некоторых

вариантах реализации два олефина из двух боковых цепей связаны вместе посредством метатезиса олефинов с образованием сшивки. В некоторых вариантах реализации сшивка предпочтительно образована боковыми цепями аминокислотных остатков, которые не находятся в соответствующих положениях представляющей интерес мишени. В некоторых вариантах реализации сформированная сшивка не нарушает взаимодействия между пептидом и представляющей интерес мишенью.

[265] В некоторых вариантах реализации предлагаемая сшивка представляет собой углеводородную сшивку. В некоторых вариантах реализации, углеводородная сшивка не содержит гетероатомов в цепи, причем цепь сшивки представляет собой кратчайшее ковалентное соединение в сшивке от одного конца сшивки до другого конца сшивки.

[266] В некоторых вариантах реализации, предлагаемая сшивка представляет собой неуглеводородную сшивку. В некоторых вариантах реализации неуглеводородная сшивка содержит один или несколько гетероатомов в цепи, причем цепь сшивки представляет собой кратчайшее ковалентное соединение внутри сшивки от одного конца сшивки до другого конца сшивки. В некоторых вариантах реализации неуглеводородная сшивка представляет собой карбаматную сшивку в том смысле, что она содержит в своей цепи фрагмент $-N(R')-C(O)-O-$. В некоторых вариантах реализации неуглеводородная сшивка представляет собой сшивку аминокислотной группы в том смысле, что она содержит в своей цепи фрагмент $-N(R')-$, причем фрагмент $-N(R')-$ не является частью $-N(R')-C(O)-O-$. В некоторых вариантах реализации неуглеводородная сшивка представляет собой сшивку аминокислотной группы в том смысле, что она содержит в своей цепи фрагмент $-N(R')-$, причем фрагмент $-N(R')-$ не связан с атомом углерода, который дополнительно образует двойную связь с гетероатомом (*например*, $-C(=O)$, $-C(=S)$, $-C(=N-R')$ и т.д.).

[267] В некоторых вариантах реализации предложенный сшитый пептид содержит сшивку, которая представляет собой L^s , где L^s представляет собой $-L^{s1}-L^{s2}-L^{s3}-$, каждый из L^{s1} , L^{s2} и L^{s3} независимо представляет собой L, причем каждый L выбирают независимо, как описано в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации предложенная сшивка представляет собой L^s .

[268] В некоторых вариантах реализации, L^{s1} содержит по меньшей мере один $-N(R')-$, где R' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации $-N(R')-$ связан с двумя атомами углерода, причем ни один из указанных двух атомов углерода не образует двойной связи с гетероатомом. В некоторых вариантах реализации $-N(R')-$ не связан с $-C(O)-$. В некоторых вариантах реализации $-N(R')-$ не связан с $-C(S)-$. В некоторых вариантах реализации $-N(R')-$ не связан с $-C(=NR')-$. В некоторых вариантах реализации, L^{s1} представляет собой $-L'-N(R')-$, где

L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C₁-C₁₉ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L^{s1} представляет собой -L'-N(CH₃)-, где L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C₁-C₁₉ алифатическую группу.

[269] В других вариантах реализации R' представляет собой необязательно замещенный C₁₋₆ алкил. В некоторых вариантах реализации изобретения R' представляет собой C₁₋₆ алкил. В некоторых вариантах реализации изобретения R' представляет собой метил. В некоторых вариантах реализации атом основной цепи пептида, с которым связан L^{s1}, также связан с R¹, и R' и R¹ оба представляют собой R и образуют, вместе с промежуточными атомами между ними, необязательно замещенное кольцо, как описано в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации сформированное кольцо не содержит дополнительных кольцевых гетероатомов в дополнение к атому азота, с которым связан R'. В некоторых вариантах реализации, сформированное кольцо является 3-членным. В некоторых вариантах реализации, сформированное кольцо является 4-членным. В некоторых вариантах реализации, сформированное кольцо является 5-членным. В некоторых вариантах реализации, сформированное кольцо является 6-членным.

[270] В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C₁-C₂₀ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C₁-C₁₉ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C₁-C₁₅ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C₁-C₁₀ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C₁-C₉ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C₁-C₈ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C₁-C₇ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C₁-C₆ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C₁-C₅ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C₁-C₄ алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенный алкилен. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенный алкенилен. В некоторых вариантах реализации

изобретения L' представляет собой незамещенный алкилен. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой $-\text{CH}_2-$. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой $-(\text{CH}_2)_2-$. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой $-(\text{CH}_2)_3-$. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой $-(\text{CH}_2)_4-$. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой $-(\text{CH}_2)_5-$. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой $-(\text{CH}_2)_6-$. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой $-(\text{CH}_2)_7-$. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой $-(\text{CH}_2)_8-$. В некоторых вариантах реализации L' связан с атомом основной цепи пептида. В некоторых вариантах реализации, L' представляет собой необязательно замещенный алкенилен. В некоторых вариантах реализации изобретения L' представляет собой незамещенный алкенилен. В некоторых вариантах реализации L' представляет собой $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$.

[271] В некоторых вариантах реализации, L^{s1} содержит по меньшей мере один $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})-$, где R' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации L^{s1} представляет собой $-\text{L}'-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})-$, где каждый из L' и R' независимо имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s1} представляет собой $-\text{L}'-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})-$, где L' независимо имеет значения, описанные в данном изобретении.

[272] В некоторых вариантах реализации, L^{s1} представляет собой ковалентную связь.

[273] В некоторых вариантах реализации, L^{s1} представляет собой L' , где L' имеет значения, описанные в данном изобретении.

[274] В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой L , где L имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой L' , где L' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации L^{s2} содержит $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$. В некоторых вариантах реализации L^{s2} содержит $-(\text{CH}_2)_4-$. В некоторых вариантах реализации, L^{s2} представляет собой $-(\text{CH}_2)_4-$.

[275] В некоторых вариантах реализации, L^{s3} содержит по меньшей мере один $-\text{N}(\text{R}')-$, где R' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации $-\text{N}(\text{R}')-$ связан с двумя атомами углерода, причем ни один из указанных двух атомов углерода не образует двойной связи с гетероатомом. В некоторых вариантах реализации $-\text{N}(\text{R}')-$ не связан с $-\text{C}(\text{O})-$. В некоторых вариантах реализации $-\text{N}(\text{R}')-$ не связан с $-\text{C}(\text{S})-$. В некоторых вариантах реализации $-\text{N}(\text{R}')-$ не связан с

$-C(=NR')$ -. В некоторых вариантах реализации, L^{s3} представляет собой $-L'-N(R')$ -, где L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_{19} алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L^{s3} представляет собой $-L'-N(CH_3)$ -, где L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_{19} алифатическую группу.

[276] В некоторых вариантах реализации, L^{s3} содержит по меньшей мере один $-N(R')C(O)$ -, где R' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s3} представляет собой $-L'-N(R')C(O)$ -, где каждый из L' и R' независимо имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s3} представляет собой $-L'-N(CH_3)C(O)$ -, где L' независимо имеет значения, описанные в данном изобретении.

[277] В некоторых вариантах реализации, L^{s3} представляет собой L' , где L' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L^{s3} представляет собой необязательно замещенный алкилен. В некоторых вариантах реализации, L^{s3} представляет собой незамещенный алкилен.

[278] В некоторых вариантах реализации, L^s содержит по меньшей мере один $-N(R')$ -, где R' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации $-N(R')$ - связан с двумя атомами углерода, причем ни один из указанных двух атомов углерода не образует двойной связи с гетероатомом. В некоторых вариантах реализации $-N(R')$ - не связан с $-C(O)$ -. В некоторых вариантах реализации $-N(R')$ - не связан с $-C(S)$ -. В некоторых вариантах реализации $-N(R')$ - не связан с $-C(=NR')$ -. В некоторых вариантах реализации, L^s содержит по меньшей мере один $-N(R')C(O)$ -, где R' имеет значения, описанные в данном изобретении.

[279] В некоторых вариантах реализации, L содержит по меньшей мере один $-N(R')$ -, где R' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации $-N(R')$ - связан с двумя атомами углерода, причем ни один из указанных двух атомов углерода не образует двойной связи с гетероатомом. В некоторых вариантах реализации $-N(R')$ - не связан с $-C(O)$ -. В некоторых вариантах реализации $-N(R')$ - не связан с $-C(S)$ -. В некоторых вариантах реализации $-N(R')$ - не связан с $-C(=NR')$ -. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой $-L'-N(R')$ -, где L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_{19} алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой $-L'-N(CH_3)$ -, где L' представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_{19} алифатическую группу.

[280] В некоторых вариантах реализации, L содержит по меньшей мере один

$-N(R')C(O)-$, где R' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой $-L'-N(R')C(O)-$, где каждый из L' и R' независимо имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой $-L'-N(CH_3)C(O)-$, где L' независимо имеет значения, описанные в данном изобретении.

[281] В некоторых вариантах реализации, L представляет собой L' , где L' имеет значения, описанные в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой необязательно замещенный алкилен. В некоторых вариантах реализации изобретения L представляет собой незамещенный алкилен.

[282] В некоторых вариантах реализации, L представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_{25} алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_{20} алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_{15} алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_{10} алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_9 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_8 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_7 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_6 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_5 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_4 алифатическую группу. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой необязательно замещенный алкилен. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой необязательно замещенный алкенилен. В некоторых вариантах реализации изобретения L представляет собой незамещенный алкилен. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой $-CH_2-$. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой $-(CH_2)_2-$. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой $-(CH_2)_3-$. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой $-(CH_2)_4-$. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой $-(CH_2)_5-$. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой $-(CH_2)_6-$. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой $-(CH_2)_7-$. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой $-(CH_2)_8-$. В некоторых вариантах реализации, L связан с атомом пептида основной цепи.

В некоторых вариантах реализации, L представляет собой необязательно замещенный алкенилен. В некоторых вариантах реализации изобретения L представляет собой незамещенный алкенилен. В некоторых вариантах реализации, L представляет собой $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$.

[283] В некоторых вариантах реализации один конец сшивки соединен с атомом A^{n1} основной цепи пептида, где A^{n1} необязательно замещен R^1 и представляет собой атом аминокислотного остатка в положении n^1 аминокислоты пептида от N-конца, а другой конец соединен с атомом A^{n2} основной цепи пептида, где A^{n2} необязательно замещен R^2 (в некоторых вариантах реализации R^1 и/или R^2 представляют собой R, который может быть водородом) и представляет собой атом аминокислотного остатка в положении аминокислоты n^2 пептида от N-конца, причем каждый из n^1 и n^2 независимо обозначает целое число, и $n^2 = n^1 + m$, где m имеет значение 3-12.

[284] В некоторых вариантах реализации, m равен 3. В некоторых вариантах реализации, m равен 4. В некоторых вариантах реализации, m равен 5. В некоторых вариантах реализации, m равен 6. В некоторых вариантах реализации, m равен 7. В некоторых вариантах реализации, m равен 8. В некоторых вариантах реализации, m равен 9. В некоторых вариантах реализации, m равен 10. В некоторых вариантах реализации, m равен 11. В некоторых вариантах реализации сшивка обозначается как сшивка (i, i+m).

[285] В некоторых вариантах реализации A^{n1} представляет собой атом углерода. В некоторых вариантах реализации, A^{n1} является ахиральным. В некоторых вариантах реализации, A^{n1} является хиральным. В некоторых вариантах реализации, A^{n1} имеет R-конфигурацию. В некоторых вариантах реализации, A^{n1} имеет S-конфигурацию.

[286] В некоторых вариантах реализации, A^{n2} представляет собой атом углерода. В некоторых вариантах реализации, A^{n2} является ахиральным. В некоторых вариантах реализации, A^{n2} является хиральным. В некоторых вариантах реализации, A^{n2} имеет R-конфигурацию. В некоторых вариантах реализации, A^{n2} имеет S-конфигурацию.

[287] В некоторых вариантах реализации A^{n1} является ахиральным, и A^{n2} ахиральным. В некоторых вариантах реализации A^{n1} является ахиральным, и A^{n2} имеет R-конфигурацию. В некоторых вариантах реализации A^{n1} является ахиральным, и A^{n2} имеет S-конфигурацию. В некоторых вариантах реализации A^{n1} имеет R-конфигурацию, и A^{n2} является ахиральным. В некоторых вариантах реализации A^{n1} имеет R-конфигурацию, и A^{n2} имеет R-конфигурацию. В некоторых вариантах реализации A^{n1} имеет R-конфигурацию, и A^{n2} имеет S-конфигурацию. В некоторых вариантах реализации A^{n1} имеет S-конфигурацию, и A^{n2} является ахиральным. В некоторых вариантах реализации

A^{n1} имеет S-конфигурацию, и A^{n2} имеет R-конфигурацию. В некоторых вариантах реализации A^{n1} имеет S-конфигурацию, и A^{n2} имеет S-конфигурацию.

[288] В некоторых вариантах реализации предложенная стереохимия в точках соединения сшивок с основной цепью и/или их комбинациях, необязательно, вместе с одним или несколькими структурными элементами предложенного пептида, *например*, химия сшивки (углеводородная, неуглеводородная), длина сшивки *и т.д.*, могут обеспечивать различные преимущества, такие как улучшенные выход препарата, чистоту и/или селективность, улучшенные свойства (*например*, улучшенную растворимость, улучшенную стабильность, пониженную токсичность, улучшенную селективность *и т.д.*), улучшенные активности *и т.д.* В некоторых вариантах реализации предложенная стереохимия и/или комбинации стереохимии отличаются от обычно используемых, *например*, в US 9617309, US 2015-0225471, US 2016-0024153, US 2016-0215036, US 2016-0244494, WO 2017/062518, и обеспечивают одно или несколько преимуществ, описанных в данном изобретении.

[289] В некоторых вариантах реализации сшивка может иметь различную длину, которая, в некоторых вариантах реализации, выражается числом атомов цепи сшивки. В некоторых вариантах реализации, цепь сшивки представляет собой кратчайшее ковалентное соединение в сшивке от первого конца сшивки (точка соединения с пептидной основной цепью) до второго конца сшивки, причем первый конец и второй конец соединены с двумя разными атомами основной цепи пептида. В некоторых вариантах реализации сшивка содержит 5-30 атомов цепи, *например*, от 5, 6, 7, 8, 9 или 10 до 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации сшивка содержит 5 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 6 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 7 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 8 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 9 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 10 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 11 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 12 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 13 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 14 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 15 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 16 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 17 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 18 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 19 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 20 атомов цепи. В

некоторых вариантах реализации сшивка имеет длину 5 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 6 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 7 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 8 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 9 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 10 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 11 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 12 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 13 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 14 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 15 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 16 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 17 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 18 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 19 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 20 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка имеет длину 8-15 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации сшивка содержит 8-12 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 9-12 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 9-10 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит 8-10 атомов цепи. В некоторых вариантах реализации длину сшивки можно регулировать в соответствии с расстоянием между аминокислотными остатками, которые она соединяет, например, для сшивки (i, i+7) может потребоваться более длинная сшивка, чем для сшивки (i, i+4). Длину сшивок можно описать иначе. Например, в некоторых вариантах реализации длина сшивки может быть описана как общее количество атомов цепи и не входящих в цепь кольцевых атомов, где не входящий в цепь кольцевой атом представляет собой атом сшивки, который образует кольцо с одним или несколькими атомами цепи, но не является атомом цепи в том смысле, что он не входит в кратчайшее ковалентное соединение от первого конца сшивки ко второму концу сшивки. В некоторых вариантах реализации сшивки, образованные с применением мономера А (который содержит азетидиновый фрагмент), мономера В (который содержит пирролидиновый фрагмент), и/или мономера С (который содержит пирролидиновый фрагмент) могут содержать один или два не входящих в цепь кольцевых атома, как проиллюстрировано в примерах сшитых пептидов.

[290] В некоторых вариантах реализации сшивка не имеет гетероатомов в своей цепи. В некоторых вариантах реализации сшивка содержит по меньшей мере один гетероатом в своей цепи. В некоторых вариантах реализации, сшивка содержит по меньшей мере один атом азота в своей цепи.

[291] В некоторых вариантах реализации, сшивка представляет собой L^s , где L^s является необязательно замещенной двухвалентной C_{8-14} алифатической группой, причем одно или несколько метиленовых звеньев алифатической группы необязательно и независимо замещены на $-C(R')_2-$, $-Cy-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')-$, $-C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$, $-C(O)S-$ или $-C(O)O-$. В некоторых вариантах реализации, сшивка представляет собой L^s , где L^s является необязательно замещенной двухвалентной C_{9-13} алифатической группой, причем одно или несколько метиленовых звеньев алифатической группы необязательно и независимо замещены на $-C(R')_2-$, $-Cy-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')-$, $-C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$, $-C(O)S-$ или $-C(O)O-$. В некоторых вариантах реализации, сшивка представляет собой L^s , где L^s является необязательно замещенной двухвалентной C_{10-15} алифатической группой, причем одно или несколько метиленовых звеньев алифатической группы необязательно и независимо замещены на $-C(R')_2-$, $-Cy-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')-$, $-C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$, $-C(O)S-$ или $-C(O)O-$. В некоторых вариантах реализации, сшивка представляет собой L^s , где L^s является необязательно замещенной двухвалентной C_{11-14} алифатической группой, причем одно или несколько метиленовых звеньев алифатической группы необязательно и независимо замещены на $-C(R')_2-$, $-Cy-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')-$, $-C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$, $-C(O)S-$ или $-C(O)O-$. В некоторых вариантах реализации сшивка представляет собой сшивку $(i, i+4)$, в которой, не считая двух аминокислотных остатков, непосредственно связанных со сшивкой, три аминокислотных остатка расположены между двумя аминокислотными остатками, непосредственно связанными со сшивкой. В некоторых вариантах реализации, сшивка представляет собой сшивку $(i, i+7)$, в которой, не считая двух аминокислотных остатков, непосредственно связанных со сшивкой, шесть аминокислотных остатков расположены между двумя аминокислотными остатками, непосредственно связанными со сшивкой.

[292] В некоторых вариантах реализации для каждого из L^s , L^{s1} , L^{s2} и L^{s3} , любые замены метиленовых звеньев, если таковые имеются, производятся на $-N(R')-$ или $-N(R')-C(O)-$.

[293] В некоторых вариантах реализации олефин в сшивке является *Z*-олефином. В некоторых вариантах реализации, олефин в сшивке является *E*-олефином. В некоторых вариантах реализации предложенная композиция содержит сшитые пептиды, имеющие

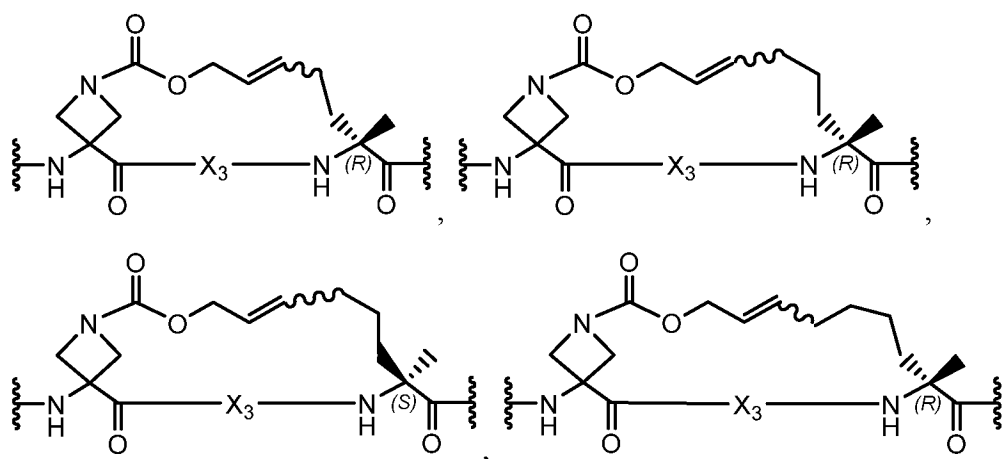
сшивку, содержащую *Z*-олефин, и сшитые пептиды, имеющие сшивку, содержащую *E*-олефин. В некоторых вариантах реализации предложенная композиция содержит сшитые пептиды, имеющие сшивку, содержащую *Z*-олефин. В некоторых вариантах реализации, предложенная композиция содержит сшитые пептиды, имеющие сшивку, содержащую *E*-олефин. В некоторых вариантах реализации идентичные в остальном сшитые пептиды, которые отличаются только *E/Z*-конфигурацией олефина сшивки, демонстрирует различные свойства и/или активности, как продемонстрировано в данном документе. В некоторых вариантах реализации сшитые пептиды с *E*-олефином в сшивке могут обеспечивать определенные желаемые свойства и/или активности с учетом контекста. В некоторых вариантах реализации, сшиты пептиды с *Z*-олефином в сшивке могут обеспечивать определенные желаемые свойства и/или активности с учетом контекста.

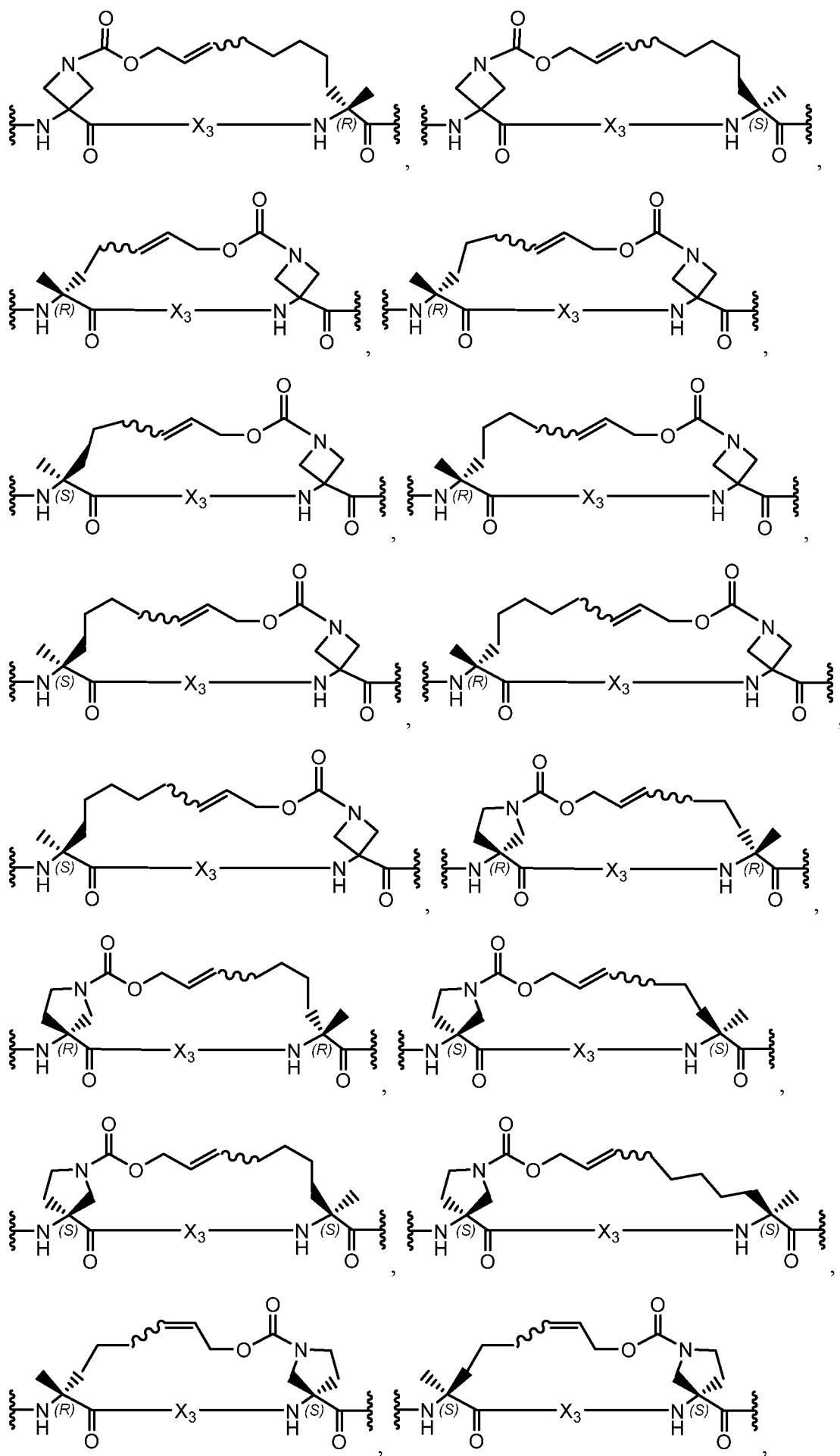
[294] В некоторых вариантах реализации две сшивки могут быть связаны с одним и тем же атомом пептидной основной цепи, образуя структуру «стежка» (stitch).

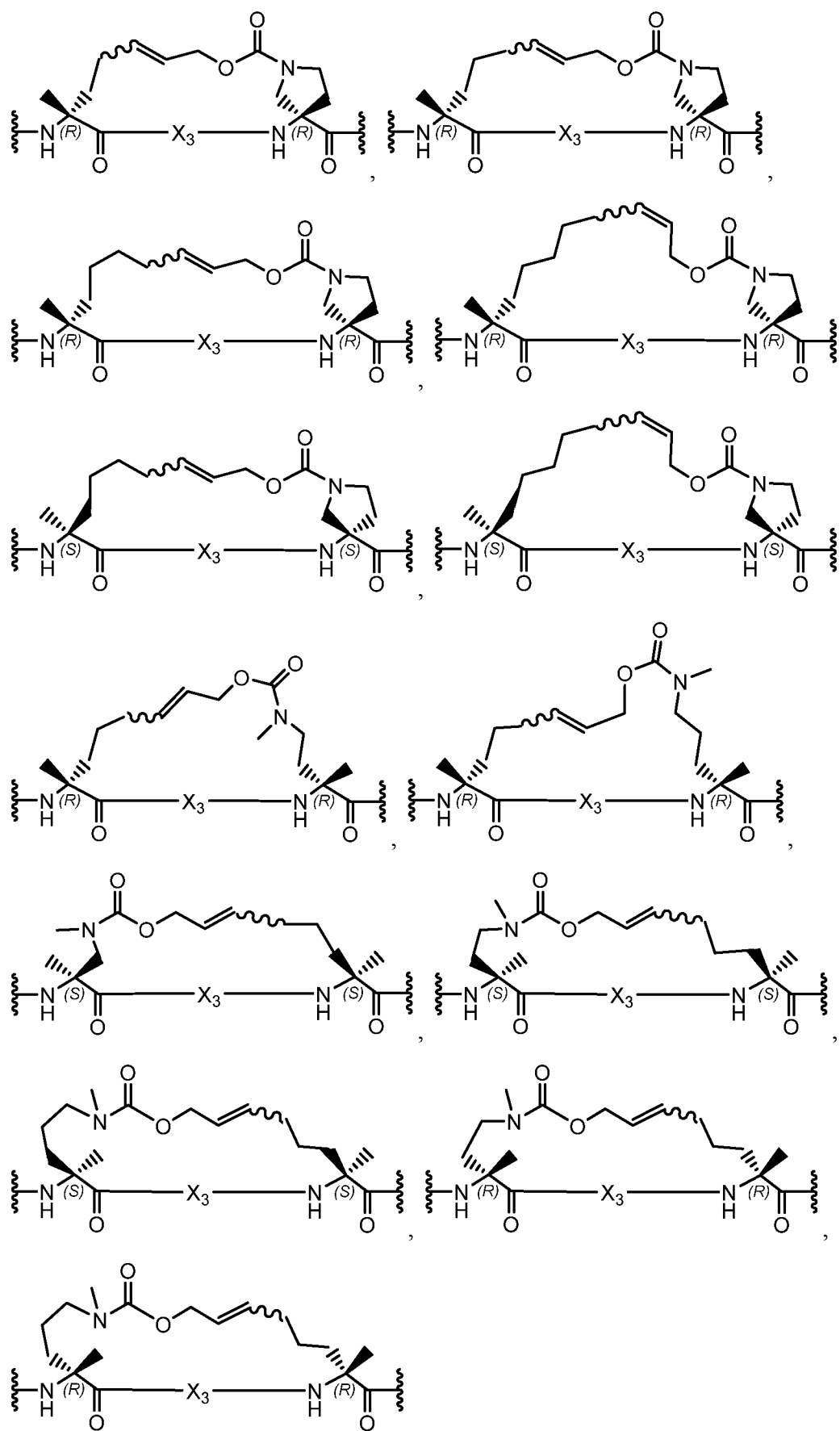
[295] В некоторых вариантах реализации сшивка выполнена по замковой схеме (Pro-lock), в которой один конец сшивки соединен с альфа-углеродом остатка пролина.

[296] В некоторых вариантах реализации типичным примером сшивки является сшивка, проиллюстрированная ниже в Таблицах S-1, S-2, S-3 и S-4 (с примером пептидной основной цепи, представленным для ясности (может быть применена к другой пептидной основной цепи), X обозначают аминокислотные остатки). В некоторых вариантах реализации олефин имеет *Z*-конфигурацию. В некоторых вариантах реализации олефин имеет *E*-конфигурацию. В некоторых вариантах реализации сшивку (*i*, *i*+4) выбирают из Таблицы S-1. В некоторых вариантах реализации сшивку (*i*, *i*+4) выбирают из Таблицы S-2. В некоторых вариантах реализации, сшивку (*i*, *i*+7) независимо выбирают из Таблицы S-3. В некоторых вариантах реализации, сшивку (*i*, *i*+7) независимо выбирают из Таблицы S-4.

[297] Таблица S-1 Примеры сшивок

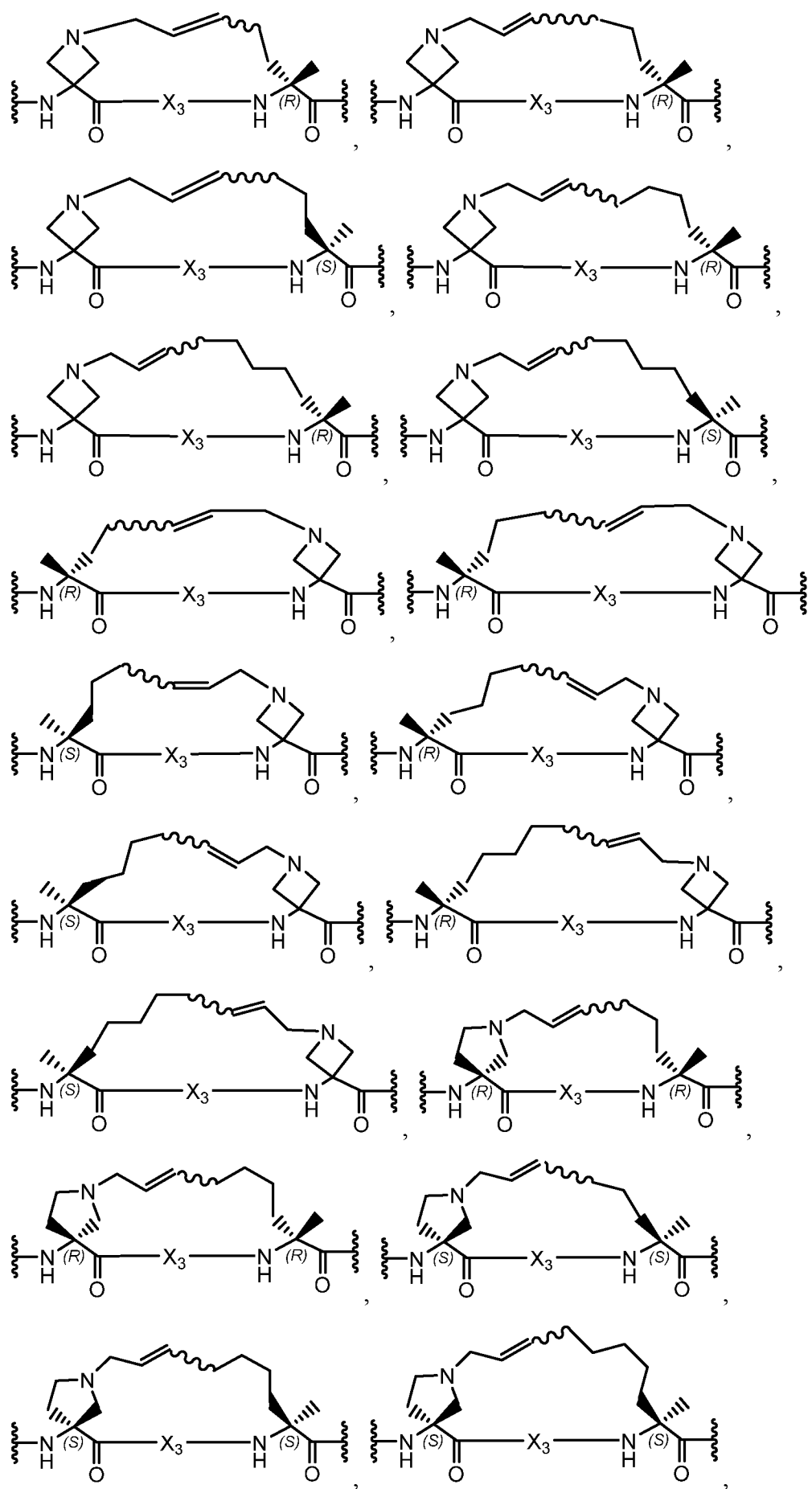


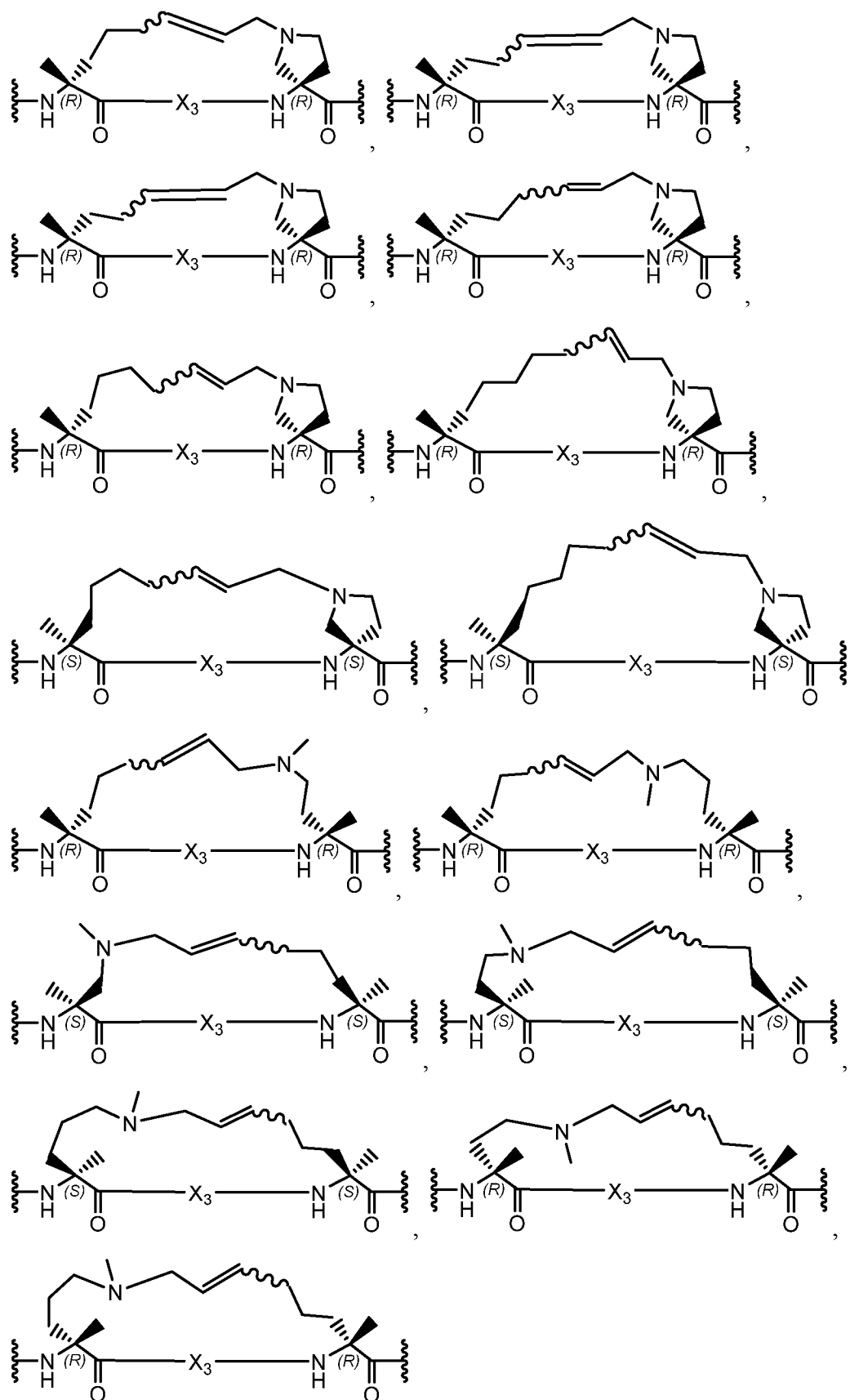




[298]

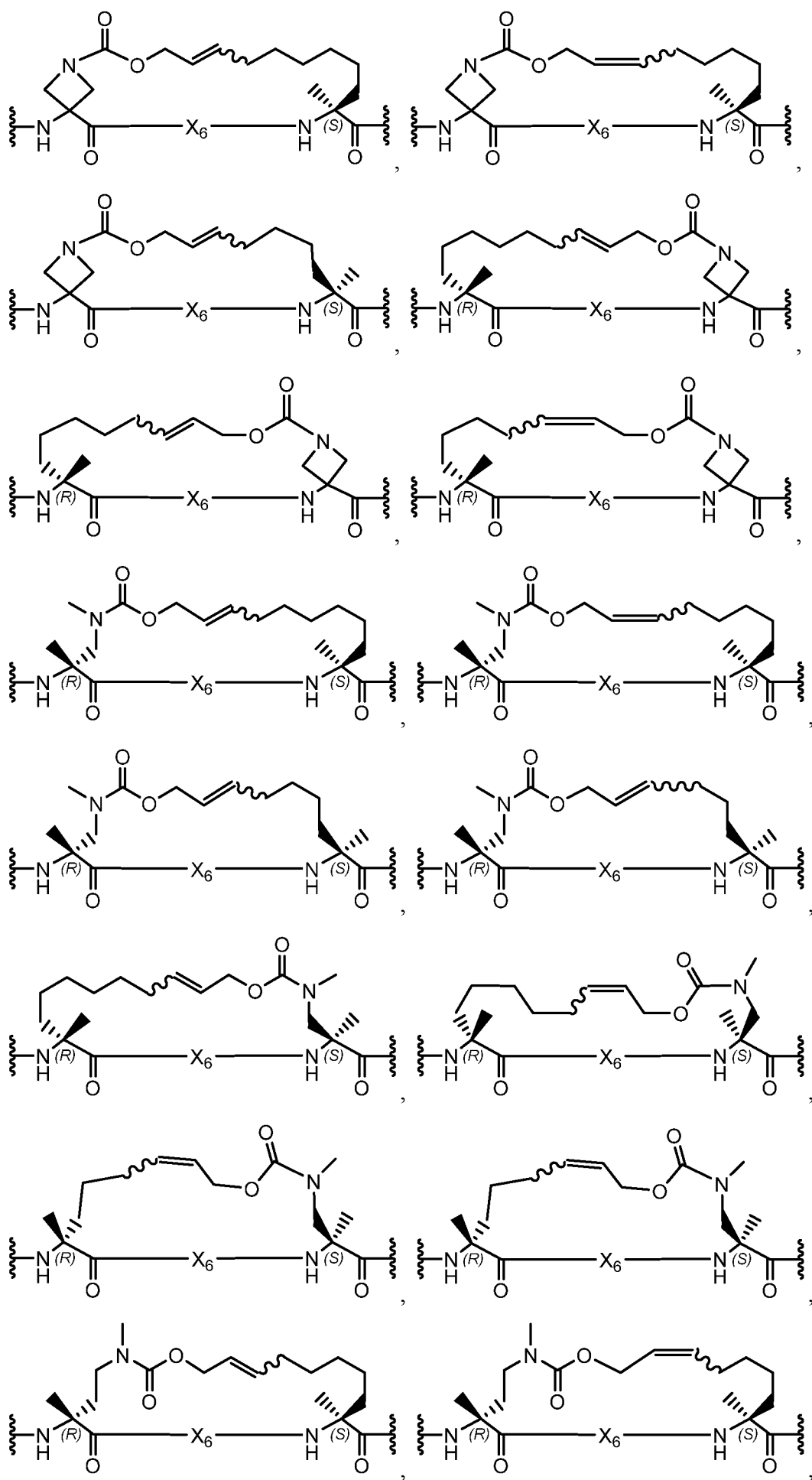
Таблица S-2 Примеры сшивок

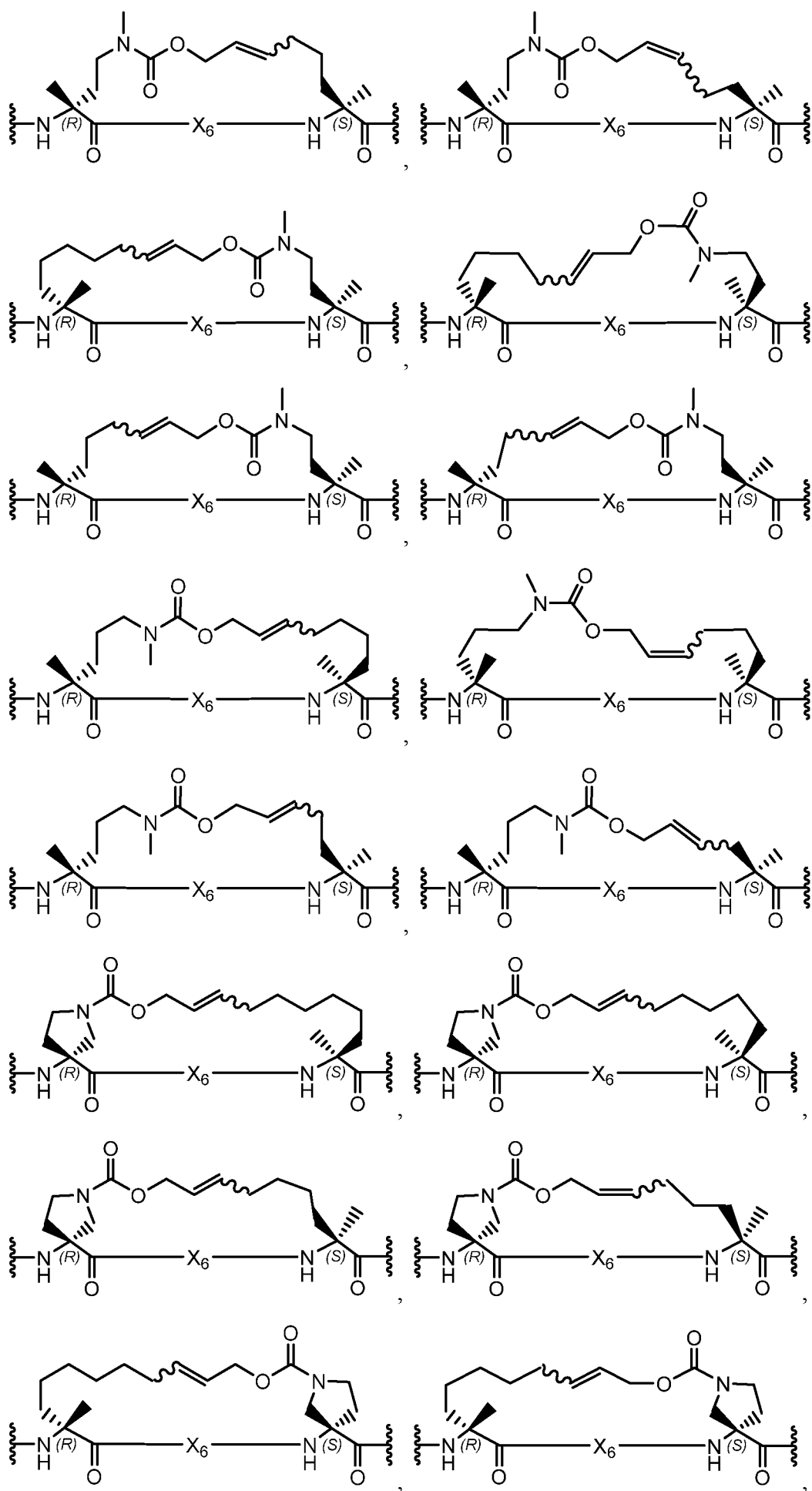


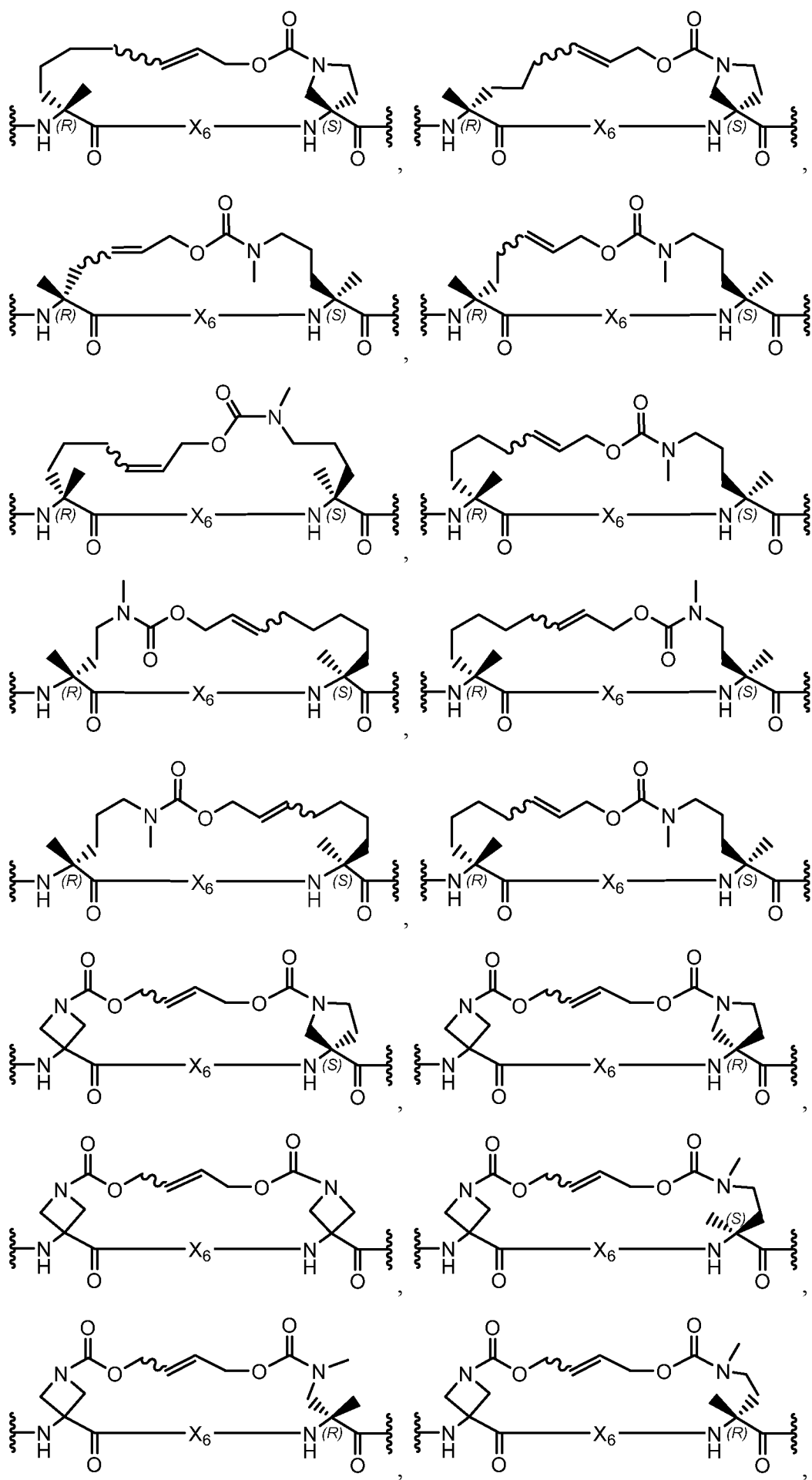


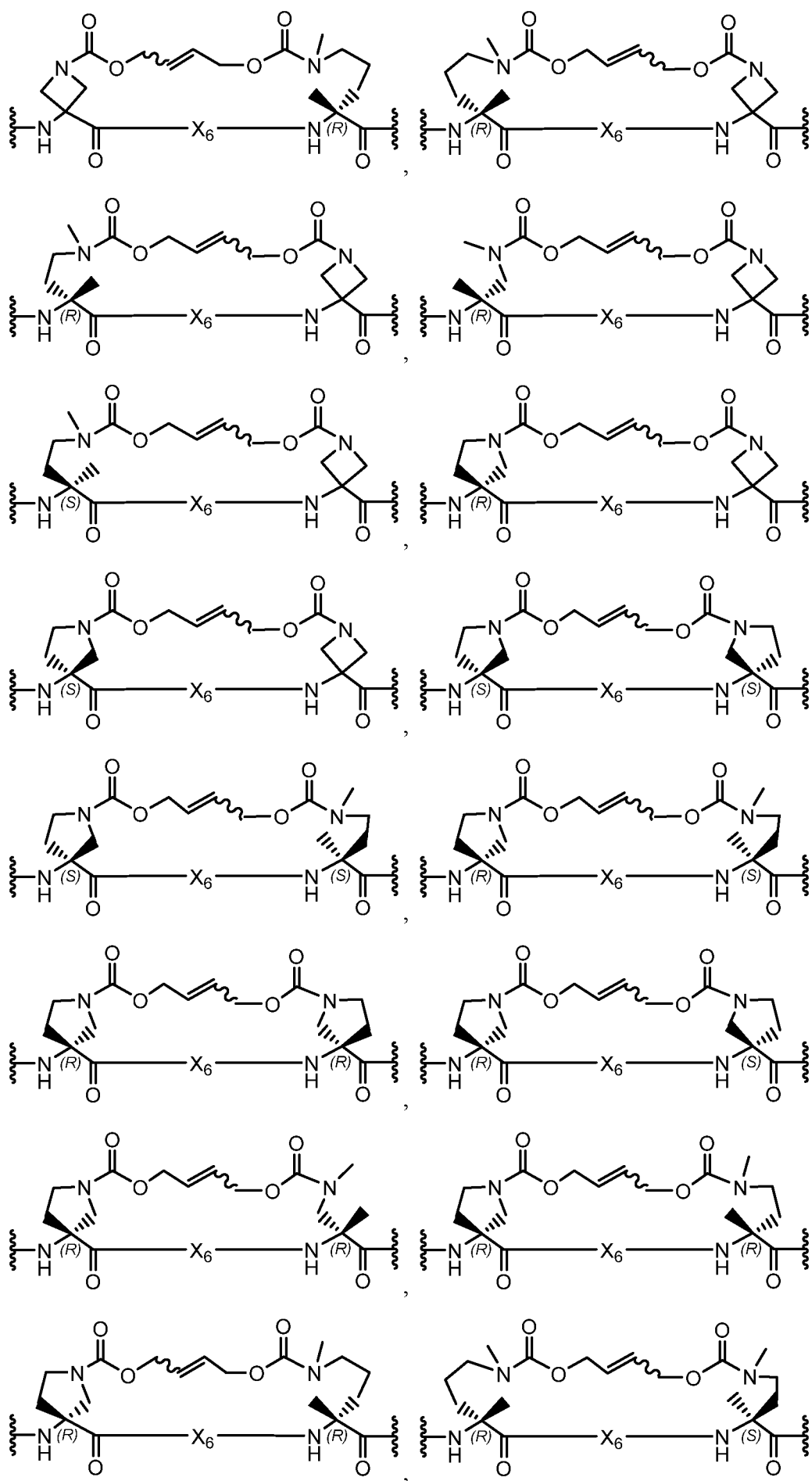
[299]

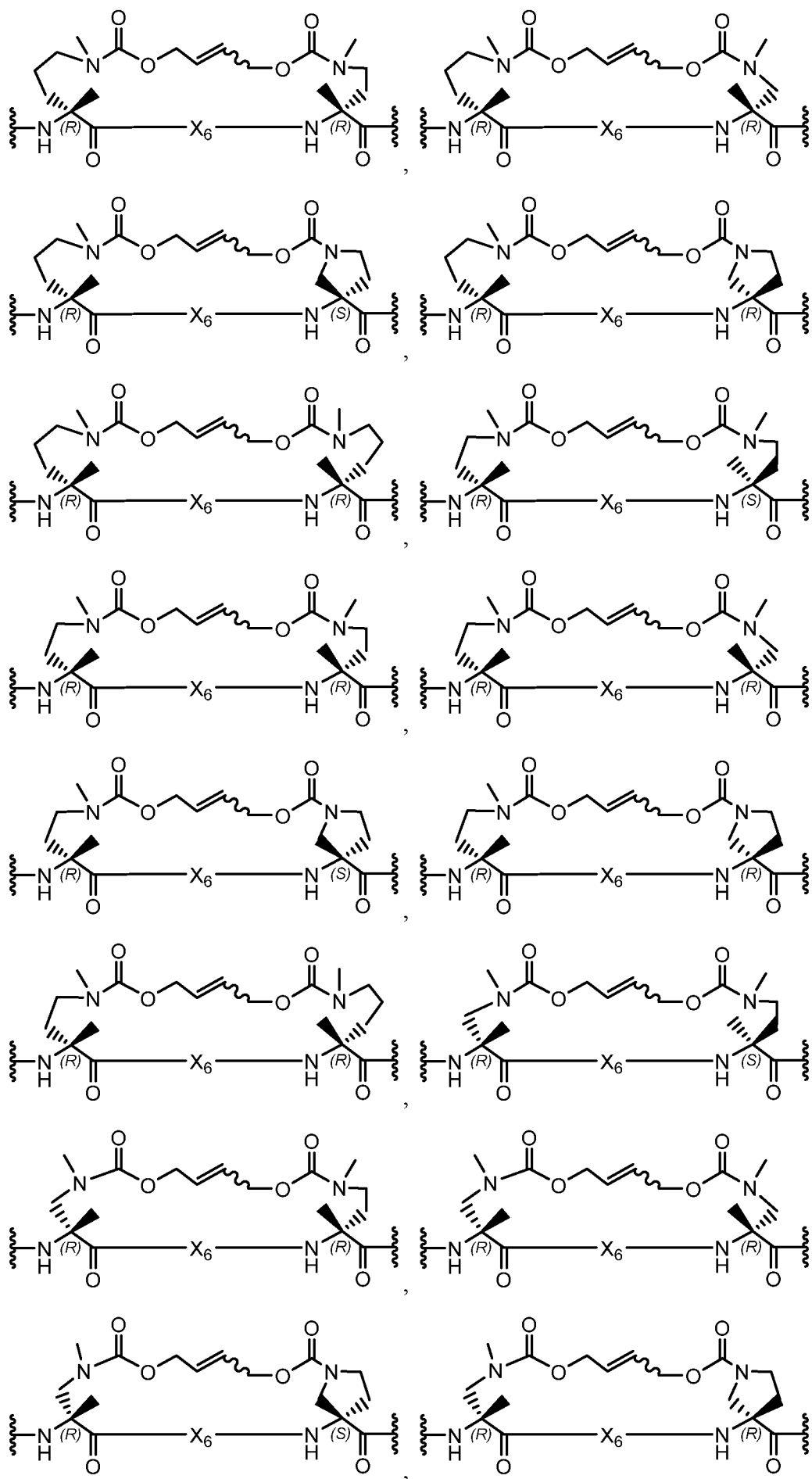
Таблица S-3 Примеры сшивок

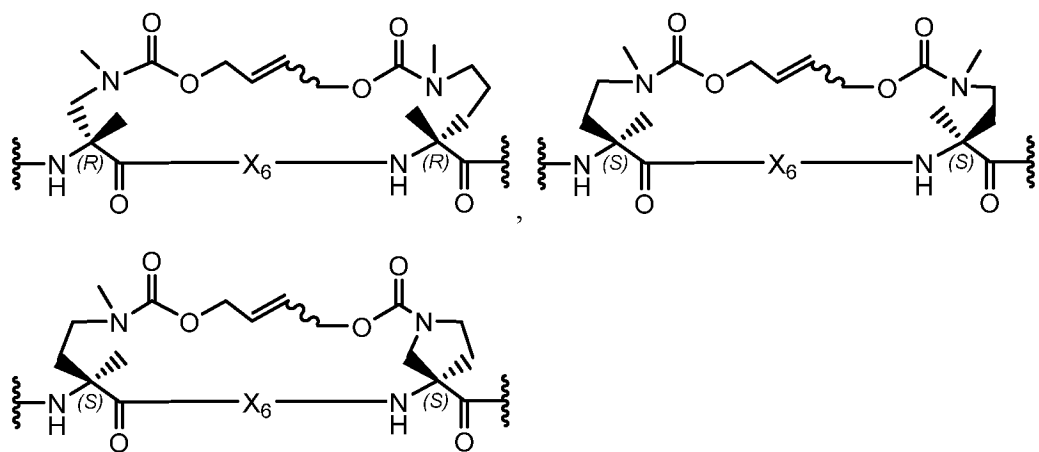




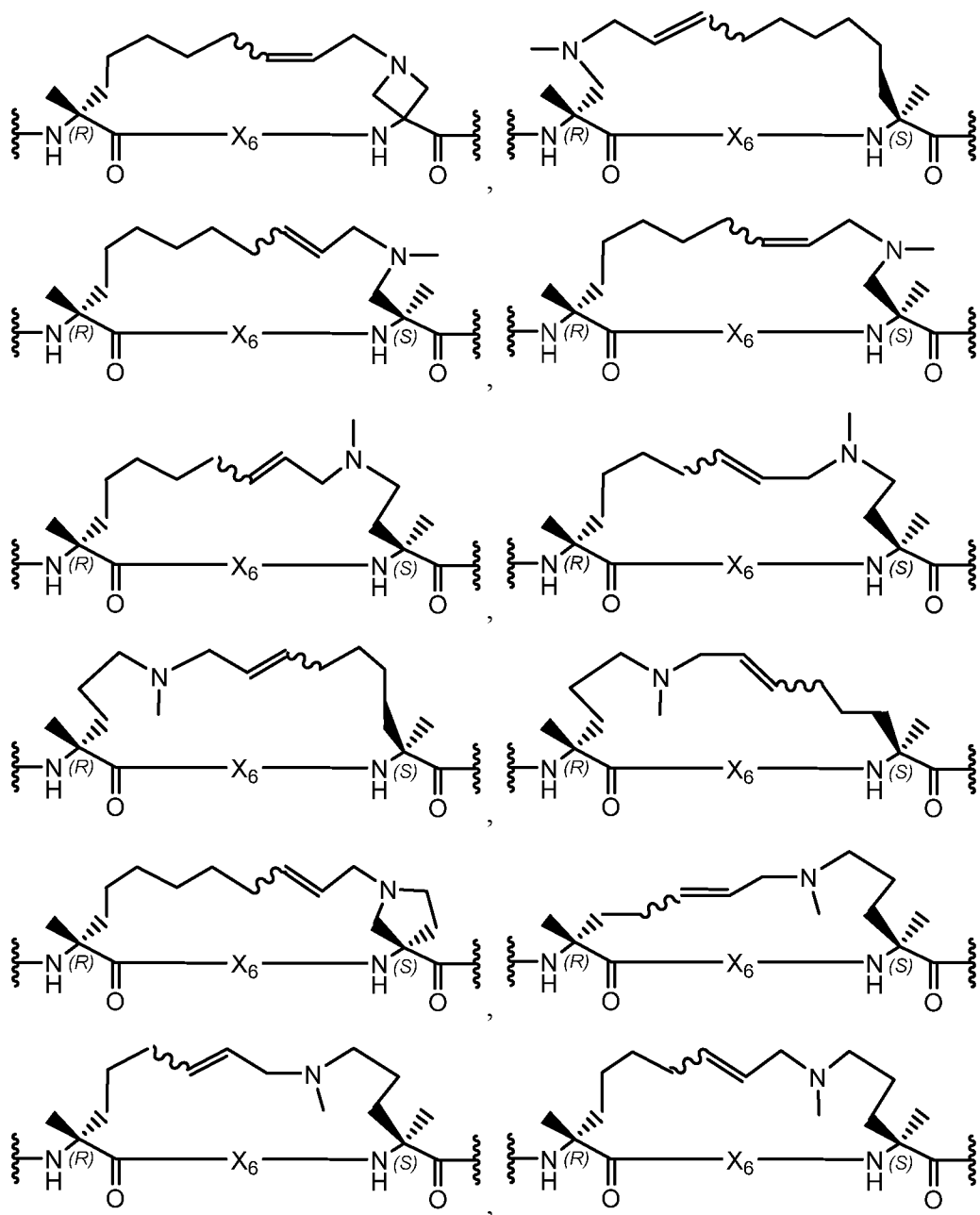








[300] Таблица S-4 Примеры сшивок



[301] В некоторых вариантах реализации пептиды, описанные в данном документе (например, сшитые пептиды, например, сшитые цистеинами пептиды, сшитые не цистеинами пептиды, которые являются вариантами сшитых цистеинами пептидов, как описано в данном документе, и/или их коллекции) характеризуются, например, в отношении одной или нескольких характеристик, выбранных из группы, состоящей из: характеристик связывания - например, по отношению к конкретной представляющей интерес мишени; характеристик стабильности, например, в растворе или в высушенном виде; характеристик проникновения в клетки и т.д., и их комбинаций.

[302] В некоторых вариантах реализации характеристика связывания может представлять собой или включать специфичность, аффинность, скорость ассоциации, скорость диссоциации и т.д., необязательно при (или в диапазоне) определенных условий, таких как, например, концентрация, температура, pH, тип клеток, присутствие или уровень конкретного конкурента и т.д.

[303] Как будет понятно специалистам в данной области техники, оценки характеристик, как описано в данном документе, могут включать сравнение с соответствующим эталоном (например, положительным или отрицательным контролем), которое в некоторых вариантах реализации может быть одновременным сравнением или, в некоторых вариантах реализации, историческим сравнением.

[304] В некоторых вариантах реализации желательными характеристиками пептида могут быть, например: связывание с желаемой мишенью (например, аффинность связывания по меньшей мере менее 1 мкМ, предпочтительно, менее 50 нМ); проникновение в клетки (например, при измерении с помощью анализов на основе флуоресценции или масс-спектрометрии клеточных фракций и т.д.); активность (например, модулирование одной или нескольких функций мишени, которые могут быть оценены с помощью клеточного репортерного анализа (например, с значениями IC₅₀ ниже концентрации, например, 1 мкМ, 500 нМ и т.д.), животной модели и/или субъекта; стабильность, которую можно оценить с помощью ряда анализов (например, в фармакокинетическом исследовании на крысах (например, при введении перорально, внутривенно (iv), внутривентально (ip) и т.д.) с значением конечного периода полувыведения больше подходящего времени, например, 1 часа); низкая токсичность, которую можно оценить с помощью ряда анализов (например, стандартных анализов всасывания, распределения, метаболизма и выделения (ADME)/токсичности); и/или низкие уровни цитотоксичности (например, низкие уровни лактатдегидрогеназы (ЛДГ), высвобождаемой из клеток при обработке подходящей концентрацией пептида, например, примерно 10 мкМ).

Получение пептидов

[305] В данной области техники известны различные технологии получения сшитых пептидов, которые могут применяться в соответствии с данным изобретением. Специалистам в данной области техники, читающим данное изобретение, будет вполне понятно, какие такие технологии применимы в каких аспектах данного изобретения.

[306] В некоторых вариантах реализации, как описано в данном документе, определенные сшитые пептиды и, в частности, сшитые цистеином пептиды, могут быть предоставлены в и/или получены с помощью биологической системы и проведения реакции с предлагаемым реагентом, например, имеющим структуру $R^x-L^{s2}-R^x$ формулы **R-I**, или его солью.

[307] В некоторых вариантах реализации пептиды получают на твердой фазе в синтезаторе, как правило, с применением Fmoc-химии.

[308] В некоторых вариантах реализации сшивки образуются путем метатезиса олефинов. В некоторых вариантах реализации двойную связь продукта метатезиса восстанавливают/гидрируют. В некоторых вариантах реализации из карбаматного фрагмента сшивки удаляют CO_2 . В некоторых вариантах реализации предложенные сшитые пептиды дополнительно модифицированы, и/или сопряжены с другими объектами. Условия и/или реагенты для этих реакций широко известны в данной области техники и могут быть осуществлены в соответствии с данным изобретением для получения сшитых пептидов.

[309] Свойства и/или активности предлагаемых сшитых пептидов можно легко оценить в соответствии с данным изобретением, например, путем использования одного или нескольких методов, описанных в примерах.

[310] В некоторых вариантах реализации технологии получения и/или оценки предлагаемых сшитых пептидов включают описанные в US 9617309, US 2015-0225471, US 2016-0024153, US 2016-0215036, US2016-0244494, WO 2017/062518 *и т.д.*

[311] В некоторых вариантах реализации предложенный агент, например, предложенный пептид, имеет чистоту 60-100%. В некоторых вариантах реализации предложенный агент имеет чистоту по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по меньшей мере 60%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по меньшей мере 70%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по меньшей мере 80%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по меньшей мере 85%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по

меньшей мере 90%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по меньшей мере 91%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по меньшей мере 92%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по меньшей мере 93%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по меньшей мере 94%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по меньшей мере 95%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по меньшей мере 96%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по меньшей мере 97%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по меньшей мере 98%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по меньшей мере 99%. В некоторых вариантах реализации чистота составляет по меньшей мере 99,5%.

[312] В некоторых вариантах реализации предложенные способы обеспечивают высокий выход. В некоторых вариантах реализации выход составляет 50-100%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 60%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 65%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 70%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 75%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 80%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 85%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 90%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 91%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 92%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 93%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 94%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 95%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 96%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 97%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 98%. В некоторых вариантах реализации выход составляет по меньшей мере 99%.

[313] В некоторых вариантах реализации предлагаемый способ обеспечивает высокую *E/Z*-селективность по олефину. В некоторых вариантах реализации предложенная селективность благоприятствует *E*-изомеру. В некоторых вариантах реализации, предложенная селективность благоприятствует *Z*-изомеру. В некоторых вариантах реализации отношение *E:Z* составляет по меньшей мере 1:1, 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1 или 100:1. В некоторых вариантах реализации отношение *Z:E* составляет по меньшей мере 1:1, 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1,

[illegible]

[314] В некоторых вариантах реализации способ включает период времени при температуре выше комнатной. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 25-200 °C. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 25 °C. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 30 °C. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 35 °C. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 40 °C. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 45 °C. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 50 °C. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 55 °C. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 60 °C. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 65 °C. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 70 °C. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 75 °C. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 80 °C. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 85 °C. В некоторых

вариантах реализации температура составляет примерно 90 °С. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 95 °С. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 100 °С. В некоторых вариантах реализации температура составляет примерно 150 °С. В некоторых вариантах реализации, температура превышает примерно 150 °С.

Композиции пептидов

[315] Помимо прочего, в данном описании предлагаются композиции, которые содержат пептиды или иным образом связаны с ними, например, сшитые пептиды, как описано в данном документе.

[316] Например, в некоторых вариантах реализации предусматриваемые композиции представляют собой или содержат элементы системы фагового дисплея, которая кодирует и/или экспрессирует сшитые пептиды (например, сшитые цистеином пептиды) или их коллекцию, как описано в данном документе.

[317] В некоторых вариантах реализации предложенные композиции представляют собой или включают систему анализа для характеристики (и необязательно включения) сшитого пептида, как описано в данном документе.

[318] В некоторых вариантах реализации предлагаемые композиции представляют собой фармацевтические композиции, например, которые содержат или доставляют один или несколько сшитых пептидов (например, в частности, один или несколько сшитых не цистеинами пептидов, которые в некоторых вариантах реализации могут соответствовать и/или быть вариантом исходного сшитого цистеинами пептида, как описано в данном документе).

[319] В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит пептидный агент в сочетании с фармацевтически приемлемым эксципиентом (например, носителем).

[320] В некоторых вариантах реализации пептидная композиция может включать или доставлять конкретную форму (например, конкретный оптический изомер, диастереомер, солевую форму, форму ковалентного конъюгата [например, ковалентно прикрепленную к фрагменту-носителю] и т.д., или их комбинацию) пептидного агента, как описано в данном документе). В некоторых вариантах реализации пептидный агент, входящий в состав фармацевтической композиции или доставляемый ею, описанный в данном документе, не связан ковалентно с фрагментом носителя.

[321] В некоторых вариантах реализации предложенная терапевтическая композиция может содержать один или несколько дополнительных терапевтических

агентов и/или один или несколько стабилизаторов и/или один или несколько агентов, которые изменяют (например, охватывают или ограничивают конкретной тканью, областью или участком) скорость или степень доставки с течением времени.

Применение и приложения

[322] В некоторых вариантах реализации данного изобретения предлагаются определенные сшитые пептиды и/или другие технологии (например, коллекции сшитых пептидов, и/или биологическая система, адаптированная для экспрессии или отображения и/или экспрессирующая или отображающая такой сшитый пептид (пептиды) и т.д.) для разработки и/или применения сшитых пептидов (например, связывающих представляющую интерес мишень).

[323] В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает определенные сшитые пептиды или их коллекции (например, включая коллекции, в которых отдельные пептиды могут быть слиты с белком оболочки фага) и/или биологическую систему, адаптированную для экспрессии или отображения и/или экспрессирующую или отображающую такой сшитый цистеинами пептид (пептиды). В некоторых вариантах реализации некоторые предложенные сшитые пептиды и/или другие технологии могут применяться для идентификации и/или характеристики одной или нескольких желаемых структурных особенностей (например, аминокислотную последовательность, расположение и/или структура сшивки [например, длина, состав, степень стерических затруднений и т.д.]) сшитого пептида, который взаимодействует с представляющей интерес мишенью (например, связывается с ней). В некоторых вариантах реализации некоторые предложенные сшитые пептиды и/или другие технологии полезны для разработки сшитых пептидов (например, сшитых не цистеином пептидов), которые соответствуют (например, имеют значительную структурную идентичность и, необязательно, структурную идентичность с эталонным сшитым цистеином пептидом, за исключением замены цистеина (цистеинов) на другой остаток (остатки), не образующие цистеиновые сшивки) определенным предложенным сшитым пептидам и/или другим технологиям.

[324] В некоторых вариантах реализации предложенный пептид или его коллекция, аминокислотная последовательность которой включает по меньшей мере два расположенных на соответствующем расстоянии остатка цистеина, используется для получения пептида, сшитого цистеинами, или его коллекции (например, посредством реакции с соединением формулы R-I.

[325] В некоторых вариантах реализации некоторые предложенные сшитые

пептиды можно идентифицировать и синтезировать с помощью технологий и примеров, описанных в данном изобретении. В некоторых вариантах реализации некоторый предложенный сшитый пептид представляет собой сшитый цистеином пептид. В некоторых вариантах реализации в сшитом цистеином пептиде, который связывает представляющую интерес мишень, цистеиновая сшивка и соответствующие остатки цистеина могут быть заменены на нецистеиновую сшивку и аминокислоты, необходимые для облегчения такой нецистеиновой сшивки.

[326] В некоторых вариантах реализации предусматриваемая коллекция пептидов (или кодирующих их нуклеиновых кислот) характеризуется тем, что все пептиды коллекции включают остатки цистеина (например, пару остатков цистеина), расположенные на расстоянии друг от друга, позволяющем обеспечить цистеиновые сшивки, как описано в данном документе, но в остальном имеют независимые аминокислотные последовательности и, необязательно, тем, что все пептиды этой коллекции имеют одинаковую длину. В некоторых вариантах реализации вырожденность и/или предпочтения в одном или нескольких положениях вносятся посредством генной инженерии и/или экспрессии выбранных последовательностей нуклеиновых кислот в биологической системе. В некоторых вариантах реализации степень вырожденности или предпочтения в одном или нескольких положениях в пептидах коллекции или библиотеки пептидов, как описано в данном документе, указывается и/или выбирается путем предварительной оценки одной или нескольких характеристик связывания родственной библиотеки или коллекции (например, со сравнимыми остатками цистеина). В некоторых вариантах реализации такая предварительная оценка осуществляется путем высокопроизводительного анализа (например, скрининга) коллекции или коллекций сшитых пептидов против представляющей интерес мишени, и применение высокопроизводительного секвенирования для декодирования генотипов некоторого подмножества коллекции сшитых пептидов может дать информацию для создания библиотеки с предпочтениями.

[327] В некоторых вариантах реализации коллекция сшитых пептидов включает сшитые цистеином пептиды, слитые с другой молекулой для применения в биологической системе (например, фаговом дисплее) или небиологической системе. В некоторых вариантах реализации после скрининга коллекции сшитых пептидов в контексте биологической системы или небиологической системы, высокопроизводительное секвенирование будет идентифицировать конкретные сшитые цистеином пептиды, которые взаимодействуют с представляющей интерес мишенью. В некоторых вариантах реализации конкретный сшитый цистеинами пептид, когда он не слит с другой молекулой

для применения в биологической системе, будет проявлять такое же или схожее взаимодействие с представляющей интерес мишенью, как и конкретный сшитый цистеином пептид, слитый с указанной молекулой. В некоторых вариантах реализации остатки цистеина и цистеиновая сшивка в конкретном сшитом цистеином пептиде, когда он не слит с другой молекулой для применения в биологической системе, могут быть заменены на другие аминокислоты и сшивки. В некоторых вариантах реализации полученный пептид сохраняет такое же или схожее взаимодействие с представляющей интерес мишенью.

[328]

[329] В некоторых вариантах реализации определенные предложенные сшитые пептиды и/или другие технологии, описанные в данном документе, могут быть полезны для модулирования одного или нескольких биологических событий или состояний, например, путем связывания с соответствующей представляющей интерес мишенью.

[330] В некоторых вариантах реализации некоторые предложенные сшитые пептиды и/или агенты других технологий, как описано в данном документе, могут быть полезны при лечении одного или нескольких заболеваний, расстройств или состояний. В некоторых вариантах реализации описанная в данном документе терапевтическая композиция, которая содержит и/или доставляет связанный пептид (например, сшитый не цистеином пептид, например, соответствующий исходному сшитому цистеином пептиду, идентифицированному и/или охарактеризованному, как описано в данном документе) вводят нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах реализации субъект мог получить и/или получать другую терапию, так что в некоторых вариантах реализации терапию предложенным пептидным агентом можно проводить в сочетании с другой терапией; в некоторых таких вариантах реализации пептидный агент, описанный в данном документе, можно вводить с помощью композиции, которая содержит и/или доставляет другое терапевтическое средство; в некоторых вариантах используются отдельные композиции.

[331] В данной области техники доступны различные стратегии введения сшитых пептидов, и их можно применять в соответствии с данным изобретением. В некоторых вариантах реализации предложенные пептиды обладают улучшенной способностью к проникновению в клетки по сравнению с идентичными в остальном, но несшитыми пептидами.

[332] В некоторых конкретных вариантах реализации некоторые предложенные сшитые пептиды и/или другие технологии полезны для связывания бета-катенина и/или модулирования одной или нескольких его активностей или эффектов.

[333] В некоторых вариантах реализации некоторые предложенные сшитые пептиды и/или другие технологии полезны при лечении состояния, расстройства или заболевания, связанного с одним или несколькими компонентами, вовлеченными в сигнальный путь Wnt/бета-катенина и/или специфически с одной или несколькими функциями бета-катенина.

[334] В некоторых вариантах реализации некоторые предложенные сшитые пептиды и/или другие технологии полезны для модуляции, например, уменьшения взаимодействия между бета-катенином и другим белком, например, аксином (Axin), APC, BCL9, TCF4/TCF7L2, TCF3/TCF7L1 и TCF7.

[335] В некоторых вариантах реализации определенные предложенные сшитые пептиды и/или другие технологии полезны при лечении состояния, расстройства или заболевания, связанного с взаимодействиями между бета-катенином и одним или несколькими сайтами бета-катенина, которые взаимодействуют с одним или несколькими белками в сигнальном пути Wnt/бета-катенина. В некоторых вариантах реализации некоторые предложенные сшитые пептиды конкурируют с и/или иначе препятствуют связыванию бета-катенина и BCL9 или снижают его. В некоторых вариантах реализации состояние, расстройство или заболевание связано с взаимодействиями между бета-катенином и одним или несколькими сайтами бета-катенина, которые взаимодействуют с BCL9. В некоторых вариантах реализации состояние, расстройство или заболевание связано с взаимодействиями с одним или несколькими белками, которые конкурируют с BCL9 за взаимодействие с бета-катенином. В некоторых вариантах реализации некоторые предложенные сшитые пептиды антагонизируют взаимодействие бета-катенина с другим белком, один или несколько сайтов связывания которого идентичны, или перекрываются с, или находятся в непосредственной близости от, одного или нескольких сайтов бета-катенина, которые взаимодействуют с BCL9 или предложенным сшитым пептидом. В некоторых вариантах реализации состояние, расстройство или заболевание связаны с взаимодействиями между бета-катенином и BCL9. В некоторых вариантах реализации указанные сшитые пептиды взаимодействуют с бета-катенином в одном или нескольких сайтах бета-катенина, которые взаимодействуют с BCL9. В некоторых вариантах реализации предложенные сшитые пептиды ингибируют одну или несколько активностей BCL9. В некоторых вариантах реализации предложенные сшитые пептиды ингибируют один или несколько активностей сигнального пути Wnt/бета-катенина.

[336] В некоторых вариантах реализации определенные предложенные сшитые пептиды и/или другие технологии полезны для лечения состояния, расстройства или заболевания, выбранного из рака, сердечного заболевания, дилатационной

кардиомиопатии, алкогольного синдрома плода, депрессии и диабета.

[337] В некоторых вариантах реализации состояние, расстройство или заболевание представляет собой состояние, расстройство или заболевание сердца.

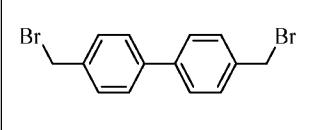
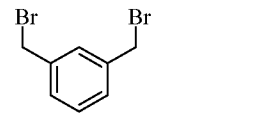
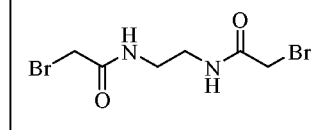
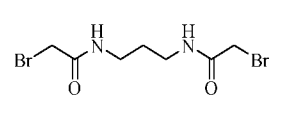
[338] В некоторых вариантах реализации состояние, расстройство или заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах реализации рак выбирают из: рака толстой кишки, колоректального рака, рака прямой кишки, рака простаты, семейного аденоматозного полипоза (САП), опухоли Вильмса, меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака яичников, рака эндометрия, медуллобластомы, пилломатриком, первичной гепатоцеллюлярной карциномы, карциномы яичников, рака молочной железы, рака легкого, глиобластомы, пилломатрикомы (pliomatrixoma), медуллобластомы, опухолей щитовидной железы, новообразований яичников. В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание представляет собой колоректальный рак. В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание представляет собой гепатоцеллюлярный рак. В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание представляет собой рак простаты. В некоторых вариантах реализации изобретения раковое заболевание представляет собой меланому. В некоторых вариантах реализации раковое заболевание связано с сигнальным путем Wnt/бета-катенина. В некоторых вариантах реализации раковое заболевание связано с бета-катенином. Как понятно специалистам в данной области, предложенные технологии применимы к различным мишеням, включая многие белковые мишени, связанные с раком.

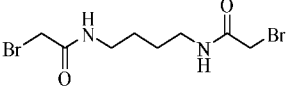
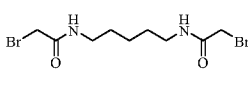
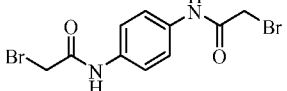
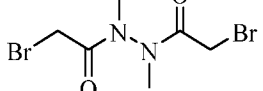
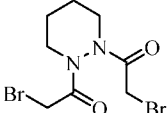
ПРИМЕРЫ

Пример 1 - Получение соединений, пригодных для сшивания пептидов

[339] Помимо прочего, данное изобретение предусматривает соединения, которые можно применять для конструирования сшивок, например, $R^x-L^s-R^x$ или его соль, или соединение формулы **R-I** или его соль. Для получения предложенных соединений по данному изобретению можно применять различные технологии. В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает соединения, перечисленные в Таблице E-1.

[340] Таблица E-I Несколько типичных синтезированных цистеиновых сшивок:

			
Линкер 1	Линкер 2	Линкер 3	Линкер 4

			
Линкер 5	Линкер 6	Линкер 7	Линкер 8
			
Линкер 9			

[341] В процедуре получения соединений, представленных в Таблице Е-1, 50 ммоль соответствующих диаминоалканов (этилендиамина для **3**, пропилендиамина для **4**, бутилендиамина для **5**, пентилендиамина для **6**, и бензол-1,4-диамина для **7**) растворяют в 100 мл хлороформа и затем добавляют 100 мл 1,5 М водного раствора K_2CO_3 . Используя ледяную баню, раствор охлаждают в течение 20 мин. При постоянном перемешивании, добавляют к смеси по каплям 100 мл 1,5 М раствора бромацетилбромида в течение 30 мин. Смесь затем перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч. Затем нерастворимое твердое вещество фильтровали через стеклянную воронку. Отфильтрованное твердое вещество повторно промывали водой и сушили с помощью центробежного испарителя при 60 °С. Органический слой, оставшийся после фильтрации, отделяли с помощью делительной воронки. Водный слой дважды промывали хлороформом. Затем все собранные органические фазы объединяли, трижды промывали H_2O и сушили над безводным Na_2SO_4 . Затем органический растворитель упаривали в роторном испарителе. Объединенные продукты анализировали с помощью масс-спектрометрии (МС) и спектрометрии ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

[342] Линкеры **8** и **9** были синтезированы по аналогичному протоколу. Вместо применения двух фаз во время реакции использовали только водную фазу. Реагентами служили дигидрохлоридные соли 1,2-диметилгидразина и гексагидропиридазина. Все остальные условия реакции были одинаковыми. Реакцию прекращали после 2 ч перемешивания при комнатной температуре после добавления бромацетилбромида.

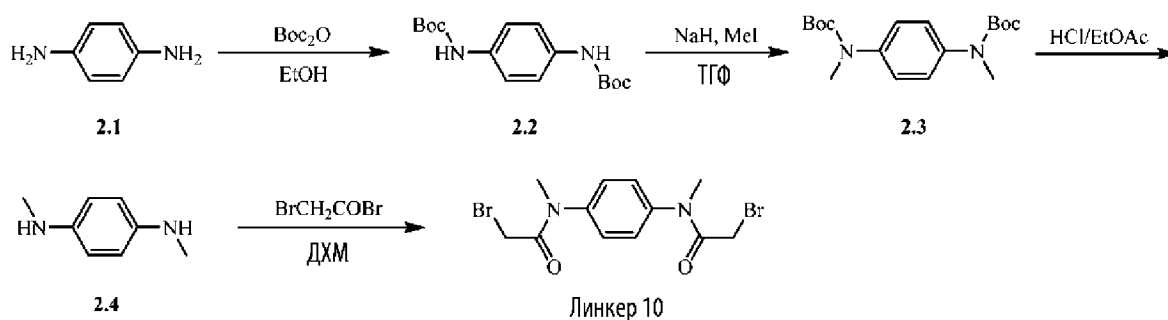
[343] Для очистки можно использовать различные технологии. Например, линкеры **3-6** и **8-9** были очищены с помощью флэш-хроматографии с нормальной фазой. В одном синтезе использовали силикагель с размером пор 40-60 мкм. Придерживались стандартного протокола. Все линкеры показали хорошее разделение при тонкослойной хроматографии с подвижной фазой 80% (об./об.) этилацетата и 20% (об./об.) гексана. Затем планшеты для ТСХ окрашивали перманганатом калия (6 г $KMnO_4$, 40 г K_2CO_3 , 10

мл 5% (мас./об.) водного NaOH, 600 мл H₂O). Значения коэффициента удерживания, R_f, линкеров для этой подвижной фазы составляли от 0,2 до 0,4, в зависимости от полярности линкера. Образцы растворяли в хлороформе и затем загружали на колонку. Затем собранные фракции проверяли с помощью тонкослойной хроматографии. Фракции, содержащие линкер, объединяли и упаривали в роторном испарителе. Очищенные и высушенные линкеры анализировали с помощью ЖХ/МС, а также Q Exactive Plus для подтверждения точной массы пептидов. Образцы отправляли на анализ ¹H ЯМР. Образцы для ¹H ЯМР готовили с применением CDCl₃ в качестве растворителя, и выполняли 128 сканирований при 400 МГц (Фиг. 1-7).

Пример 2 - Получение соединений, пригодных для сшивания пептидов

[344] Приготовление дополнительных типичных соединений, которые можно применять, например, для конструирования сшивок, например, R^x-L^s-R^x или его соли, или формулы **R-I**, или его соли, описано в Примерах 2-11.

[345] Схема E-1



[346] К раствору соединения **2.1** (2,50 г, 23,12 ммоль, 1,00 экв.) в EtOH (50 мл) добавляли порциями Boc_2O (12,1 г, 55,48 ммоль, 12,7 мл, 2,40 экв.) и гуанидина гидрохлорид (331 мг, 3,47 ммоль, 278 мкл, 0,15 экв.). По окончании добавления реакционную смесь перемешивали в течение 8 ч при 40 °C. ЖХ-МС показал полное расхождение соединения **2.1**. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Затем добавляли этилацетат (100 мл) и смесь перемешивали в течение 30 минут при 20 °C. Смесь фильтровали и влажный осадок на фильтре промывали этилацетатом (50,0 мл x 5). Органическую фазу сушили под вакуумом, получая Соединение **2.2** (5,00 г, неочищенное) в виде беловатого твердого вещества.

[347] К раствору соединения **2.2** (1,70 г, 5,51 ммоль, 1,00 экв.) в ТГФ (30,0 мл) добавляли NaH (330 мг, 8,27 ммоль, чистота 60%, 1,50 экв.) порциями при 0 °C. После завершения добавления смесь перемешивали в течение 10 минут. Затем добавляли MeI (2,60 г, 18,32 ммоль, 1,14 мл, 3,32 экв.) порциями при 0 °C. Затем смесь перемешивали в

течение 2 часов при 20 °С. Добавляли в смесь NH_4Cl (10,0 мл, насыщенный) при 0 °С. Затем водный слой экстрагировали этилацетатом (10,0 мл x 3). Органические экстракты осушали над Na_2SO_4 и концентрировали, получая 1,70 г маслянистой жидкости желтого цвета. ^1H ЯМР показал, что соединение **2.3** (1,70 г, неочищенное) было получено в виде маслянистой жидкости желтого цвета. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,23 (с, 4H), 3,17 (с, 6H), 1,40 (с, 18H).

[348] Раствор соединения **2.3** (1,60 г, 4,76 ммоль, 1,00 экв.) в HCl /этилацетате (4 М, 48,0 мл, 40,3) перемешивали в течение 2 ч при 20 °С. ТСХ (петролейный эфир/этилацетат = 1/1, R_f = 0,06) показала, что реакция завершилась. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом, получая беловатое твердое вещество (880 мг, неочищенное, 2· HCl соль). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 9,67 (шир.с, 4H), 7,27 (шир.с, 4H), 2,78 (с, 6H).

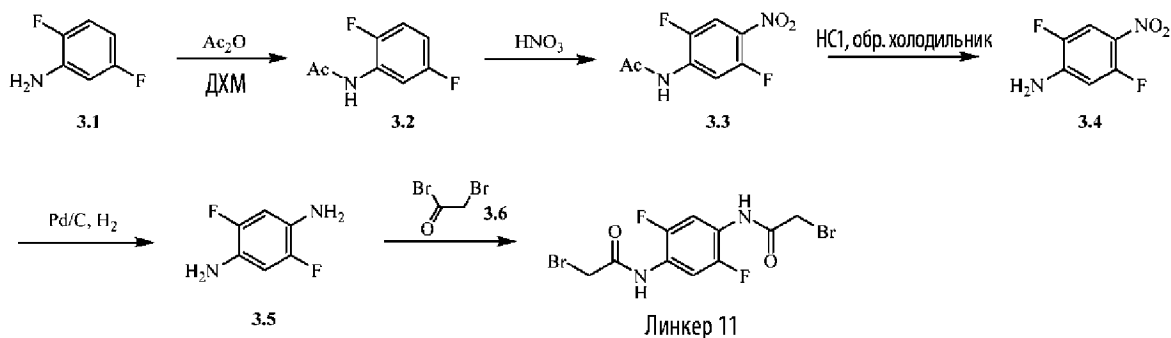
[349] Соединение **2.4** (835 мг, 3,99 ммоль, 1 экв., 2HCl) растворяли в воде (10,0 мл) и K_2CO_3 (1,21 г, 8,78 ммоль, 2,20 экв.) добавляли к смеси порциями, чтобы довести значение pH смеси до 8. Затем добавляли дихлорметан (10,0 мл x 5) для экстракции продукта. Органические слои объединяли, осушали над Na_2SO_4 и концентрировали, получая маслянистую жидкость желтого цвета (0,50 г, неочищенное, свободное основание). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 6,41 (шир.с, 4H), 4,74 (шир.с, 2H), 2,58 (шир.с, 6H).

[350] К раствору соединения **2.4** (500 мг, 3,67 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (150 мл) добавляли пиридин (697 мг, 8,81 ммоль, 711,17 мкл, 2,40 экв.) и DMAP (диметиламинопиридин) (13,5 мг, 110,14 мкмоль, 0,03 экв.) одной порцией при 0 °С. После этого, добавляли к смеси по каплям 2-бромацетилбромид (1,63 г, 8,08 ммоль, 702,71 мкл, 2,20 экв.) при примерно 0-5 °С. По окончании добавления реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 20 °С. ЖХ-МС показал, что соединение **2.4** было полностью израсходовано, и основное соединение имеет желаемую массу. Реакционную смесь промывали HCl (0,5 N, 50,0 мл x 2), затем рассолом (50,0 мл x 2). Органический слой осушали над Na_2SO_4 и затем концентрировали под вакуумом, получая **Линкер 10** (1,50 г, неочищенный) в виде твердого вещества светло-желтого цвета.

[351] Неочищенный **Линкер 10** (500 мг) подвергали очистке путем суспендирования в растворе дихлорметана/петролейного эфира (1 мл, 1/1) в течение 30 мин. Смесь фильтровали и остаток сушили под вакуумом, получая 120 мг твердого вещества светло-желтого цвета (120 мг, 317,41 мкмоль, выход 24,0%). ВЭЖХ показала чистоту 99,48%. ^1H ЯМР: (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,41 (с, 4H), 3,70 (с, 4H), 3,35 (шир.с, 6H).

Пример 3 - Получение соединений, пригодных для сшивания пептидов

[352] Схема E-2



[353] К раствору соединения **3.1** (10,0 г, 77,46 ммоль, 1 экв.) в дихлорметане (35 мл) добавляли Ac_2O (9,47 г, 92,75 ммоль, 8,69 мл, 1,20 экв.) порциями при 20 °С. По окончании добавления реакцию смесь перемешивали при 20 °С в течение 16 ч. ЖХ-МС показал, что соединение **1** израсходовано, и основной продукт представляет собой соединение **3.2** (время удерживания (r.t.) = 0,626 мин, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 171,8$). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Затем добавляли к остатку воду (80 мл) и беловатое твердое вещество собирали фильтрованием и сушили под вакуумом, получая соединение **3.2** (12,3 г, 71,87 ммоль, выход 92,8%). ^1H NMR (400 МГц, CDCl_3) δ 8,23-8,12 (м, 1H), 7,46 (шир.с, 1H), 7,03 (дт, $J = 4.8, 9.8$ Гц, 1H), 6,72 (шир.т, $J = 8.2$ Гц, 1H), 2,24 (с, 3H).

[354] К перемешиваемому раствору HNO_3 (21,9 г, 333,27 ммоль, 15,63 мл, чистота 96%, 11,41 экв.) добавляли по каплям соединение **3.2** (5,00 г, 29,22 ммоль, 1 экв.) при 0 °С. По окончании добавления реакцию смесь перемешивали при 0 °С в течение 2 ч. ЖХ-МС и ТСХ (петролейный эфир/этилацетат = 1/1, $R_f = 0,61$) показали, что соединение **3.2** было израсходовано, и основной продукт представляет собой соединение **3.3** (время удерживания (r.t.) = 0,746 мин, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 216,7$). Реакционную смесь выливали в ледяную воду (50 мл), перемешивали в течение 10 мин и затем фильтровали. Полученный осадок на фильтре промывали водой (50 мл x 3) и сушили при пониженном давлении, получая соединение **3.3** (5,72 г, 26,46 ммоль, выход 90,6%) в виде твердого вещества желтого цвета. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 10,47 (шир.с, 1H), 8,36 (дд, $J = 6,5, 14,1$ Гц, 1H), 8,21 (дд, $J = 7,0, 10,8$ Гц, 1H), 2,20 (с, 3H).

[355] К раствору соединения **3.3** (5,60 г, 25,91 ммоль, 1 экв.) в EtOH (25 мл) добавляли HCl (12 М, 58,28 мл, 26,99 экв.). По окончании добавления реакцию смесь перемешивали и нагревали с обратным холодильником при 80 °С в течение 2 ч. ТСХ (петролейный эфир/этилацетат = 1/1, $R_f = 0,08$) и ЖХ-МС показали, что соединение **3.3**

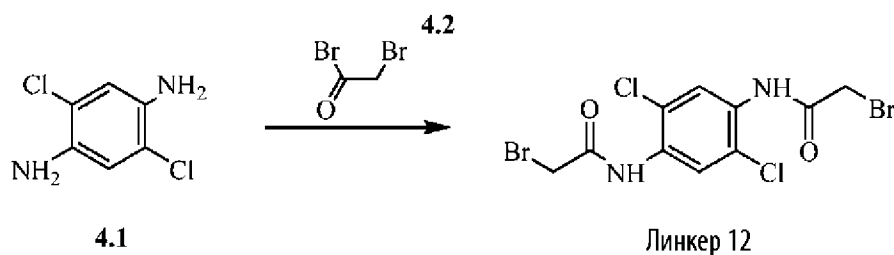
было полностью израсходовано, и основной продукт представляет собой соединение **3.4** (время удерживания (r.t.) = 0,719 мин, $[M+H]^+ = 174,8$). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Добавляли воду (60 мл) и перемешивали в течение 30 минут, а затем фильтровали. Полученный осадок на фильтре промывали водой (50 мл $\times$ 3). Полученное твердое вещество коричневого цвета сушили при пониженном давлении, получая соединение **3.4** (3,10 г, 17,81 ммоль, выход 68,8%) в виде твердого вещества коричневого цвета. 1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 7,89 (дд, $J = 7,2, 11,4$ Гц, 1H), 7,08 (шир.с, 2H), 6,62 (дд, $J = 7,3, 13,8$ Гц, 1H).

[356] К раствору соединения **3.4** (2,50 г, 14,36 ммоль, 1 экв.) в MeOH (30 мл) добавляли Pd/C (600 мг, чистота 10%) под N_2 . Суспензию дегазировали под вакуумом и несколько раз продували H_2 . Смесь перемешивали в атмосфере H_2 (103 кПа (15 psi)) при 20 °C в течение 5 ч. ЖХ-МС показала, что соединение **3.4** было израсходовано, и основной продукт представляет собой соединение **3.5** (время удерживания (r.t.) = 0,114 мин, $[M+H]^+ = 144,7$). Реакционную смесь фильтровали через слой целита, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая соединение **3.5** (1,82 г, 12,63 ммоль, выход 88,0%) в виде твердого вещества черно-коричневого цвета. 1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 6,48 (т, $J = 10,4$ Гц, 2H), 4,45 (шир.с, 4H).

[357] К раствору соединения **3.5** (1,00 г, 6,94 ммоль, 1 экв.) в дихлорметане (150 мл) добавляли пиридин (1,32 г, 16,65 ммоль, 1,34 мл, 2,4 экв.) и DMAP (25,4 мг, 208,16 мкмоль, 0,03 экв.) одной порцией при 0 °C. После этого, добавляли к смеси по каплям раствор соединения **3.6** (3,08 г, 15,26 ммоль, 1,33 мл, 2,2 экв.) в дихлорметане (50 мл) при примерно 0-5 °C. По окончании добавления реакционную смесь перемешивали при 20 °C в течение 2 ч. ТСХ (дихлорметан/MeOH = 15/1) и ЖХ-МС показали, что соединение **3.5** ($R_f = 0,23$) было израсходовано. Наблюдалось новое пятно ($R_f = 0,62$). Смесь фильтровали, и остаток промывали дихлорметаном (10 мл $\times$ 3). Остаток сушили под вакуумом, получая 2,30 г твердого вещества коричневого цвета. Неочищенный материал (200 мг) растирали в растворе ДМСО/MeOH (6 мл, отношение 1/5) в течение 30 мин, получая **Линкер 11** (120 мг, 299,82 мкмоль, выход 57,9%, чистота 96,44%) в виде твердого вещества серого цвета. 1H ЯМР (400 МГц ДМСО- d_6): δ 10,37 (с, 2H), 7,95 (т, $J = 9,8$ Гц, 2H), 4,16 (с, 4H).

Пример 4 - Получение соединений, пригодных для сшивания пептидов

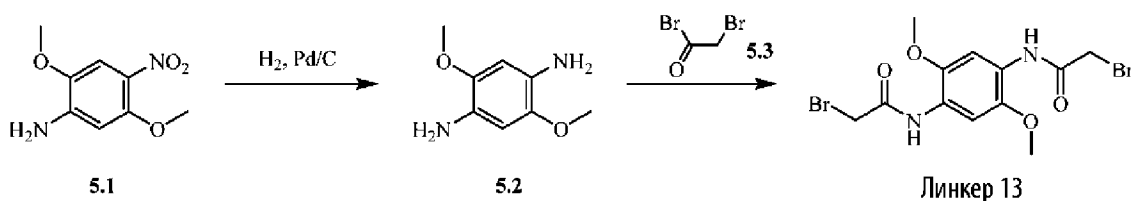
[358] Схема E-3



[359] К раствору соединения **4.1** (1,00 г, 5,65 ммоль, 1 экв.) в дихлорметане (150 мл) добавляли пиридин (1,07 г, 13,56 ммоль, 1,09 мл, 2,4 экв.) и DMAP (20,7 мг, 169,46 мкмоль, 0,03 экв.) одной порцией при 0 °С. После этого, раствор соединения **4.2** (2,51 г, 12,43 ммоль, 1,08 мл, 2,2 экв.) в дихлорметане (50 мл) добавляли к смеси по каплям при примерно 0-5 °С. По окончании добавления реакционную смесь перемешивали при 20 °С в течение 2 ч. ТСХ (дихлорметан/MeOH = 15/1) показала, что соединение **4.1** ($R_f = 0,23$) было израсходовано. Появилось новое пятно ($R_f = 0,62$). Смесь фильтровали, и остаток промывали дихлорметаном (10 мл x 3). Остаток сушили под вакуумом, получая твердое вещество белого цвета (2,30 г). Неочищенный материал (500 мг) растирали в растворе дихлорметана/MeOH (6 мл, отношение 1/1) в течение 30 мин, получая **Линкер 12** (120 мг, 285,06 мкмоль, выход 23,9%, чистота 99,51%) в виде твердого вещества белого цвета. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 10,10 (с, 2H), 7,94 (с, 2H), 5,77 (с, 1H), 4,19 (с, 4H).

Пример 5 - Получение соединений, пригодных для сшивания пептидов

[360] Схема E-4



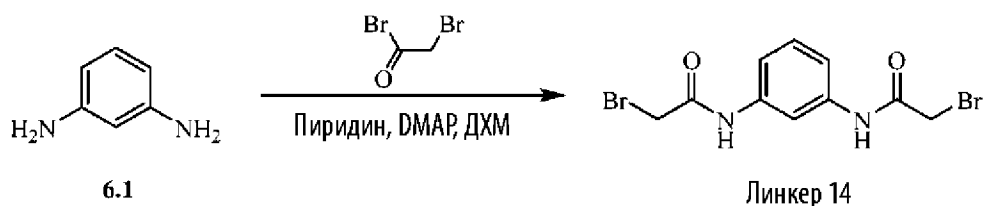
[361] К раствору соединения **5.1** (1,00 г, 5,05 ммоль, 1 экв.) в EtOH (150 мл) добавляли Pd/C (0,30 г, чистота 10,0%) одной порцией, затем реакционную смесь перемешивали при 20 °С в течение 16 ч в атмосфере H_2 (103 кПа (15 psi)). ТСХ (дихлорметан/MeOH = 15/1) показала, что соединение **5.1** ($R_f = 0,70$) было израсходовано. Появилось новое пятно ($R_f = 0,41$). Реакционную смесь фильтровали через слой целита, и фильтрат концентрировали, получая соединение **5.2** (800 мг, неочищенное) в виде твердого вещества черно-коричневого цвета.

[362] К раствору соединения **5.2** (800 мг, 4,76 ммоль, 1 экв.) в дихлорметане (100 мл) добавляли пиридин (903 мг, 11,42 ммоль, 921,39 мкл, 2,4 экв.) и DMAP (17,4 мг, 142,69 мкмоль, 0,03 экв.) одной порцией при 0 °С. После этого, раствор соединения **5.3**

(2,11 г, 10,46 ммоль, 910,43 мкл, 2,2 экв.) в дихлорметане (50 мл) добавляли к смеси по каплям при примерно 0-5 °С. По окончании добавления реакционную смесь перемешивали при 20 °С в течение 2 ч. ЖХ-МС показала, что соединение **5.2** было израсходовано, продукт представлял собой **Линкер 13** (время удерживания (r.t.) = 0,796 мин, $[M+H]^+ = 410,9$). Реакционную смесь разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали EtOAc (30 мл x 3). Объединенные органические слои осушали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , петролейный эфир/этилацетат = от 10 /1 до примерно 1/1) с получением 300 мг сырого продукта. Затем остаток подвергали очистке препаративной ВЭЖХ, получая **Линкер 13** (103 мг, 241,46 мкмоль, выход 5,08%, чистота 96,13%) в виде твердого вещества желтого цвета. 1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$): δ 9,65 (с, 2H), 7,83 (с, 2H), 4,19 (с, 4H), 3,77 (с, 7H).

Пример 6 - Получение соединений, пригодных для сшивания пептидов

[363] Схема Е-5

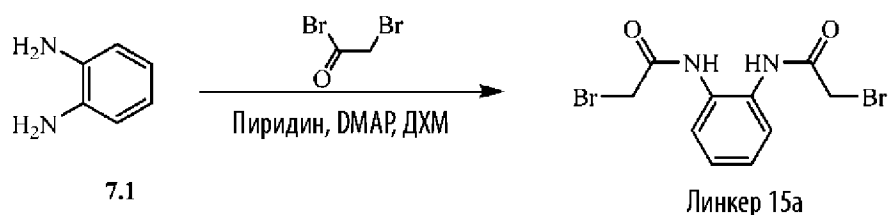


[364] К раствору соединения **6.1** (1,00 г, 9,25 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (150 мл) добавляли пиридин (1,76 г, 22,2 ммоль, 1,79 мл, 2,40 экв.) и DMAP (33,9 мг, 277 мкмоль, 0,03 экв.) одной порцией при 0 °С. После этого, раствор 2-бромацетилбромида (4,11 г, 20,3 ммоль, 1,77 мл, 2,20 экв.) в ДХМ (50,0 мл) добавляли к смеси по каплям при примерно 0-5 °С. По окончании добавления реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 20 °С. Во время перемешивания наблюдался белый осадок. ЖХ-МС показала, что соединение **6.1** было израсходовано и продукт имел желаемую массу. Смесь фильтровали и остаток промывали ДХМ (10,0 мл x 3). Остаток сушили под вакуумом, получая **Линкер 14** в виде беловатого твердого вещества (2,50 г).

[365] Неочищенный **Линкер 14** (200 мг) растирали в растворе дихлорметана/этилацетата (2,00 мл, отношение 1/1) в течение 30 мин. Смесь фильтровали, получая остаток. Остаток сушили под вакуумом, получая **Линкер 14** в виде твердого вещества белого цвета (110 мг, 314,28 мкмоль, чистота около 100%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 10,43 (шир.с, 2H), 7,94 (шир.с, 1H), 7,38-7,20 (м, 3H), 4,02 (с, 4H).

Пример 7 - Получение соединений, пригодных для сшивания пептидов

[366] Схема E-6

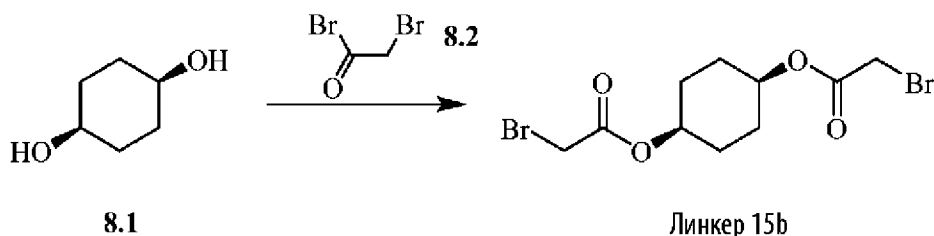


[367] К раствору соединения **7.1** (500 мг, 4,62 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (150 мл) добавляли пиридин (878 мг, 11,10 ммоль, 895 мкл, 2,4 экв.) и DMAP (17 мг, 138,71 мкмоль, 0,03 экв.) одной порцией при 0 °С. После этого, раствор 2-бромацетилбромида (2,05 г, 10,17 ммоль, 885 мкл, 2,20 экв.) в дихлорметане (50 мл) добавляли к смеси по каплям при примерно 0-5 °С. По окончании добавления реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 20 °С. Во время перемешивания наблюдался белый осадок. ТСХ (дихлорметан/метанол = 15/1) показала, что соединение **7.1** ($R_f = 0,43$) было израсходовано. Появилось новое пятно ($R_f = 0,73$). Смесь фильтровали и остаток промывали дихлорметаном (10,0 мл x 3). Остаток осушали под вакуумом, получая **Линкер 15a** (1,07 г) в виде беловатого твердого вещества.

[368] Неочищенный **Линкер 15a** (500 мг) подвергали очистке хроматографией на силикагеле (дихлорметан/метанол = от 100 / 1 до 100/1, 1,00 л), получая беловатое твердое вещество (110 мг, 312,27 мкмоль, выход 21,8%, чистота 99,36%). ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 9,72 (с, 2H), 7,52 (дд, $J = 3,8, 5,8$ Гц, 2H), 7,21 (дд, $J = 3,5, 6,0$ Гц, 2H), 4,11 (с, 4H).

Пример 8 - Получение соединений, пригодных для сшивания пептидов

[369] Схема E-7

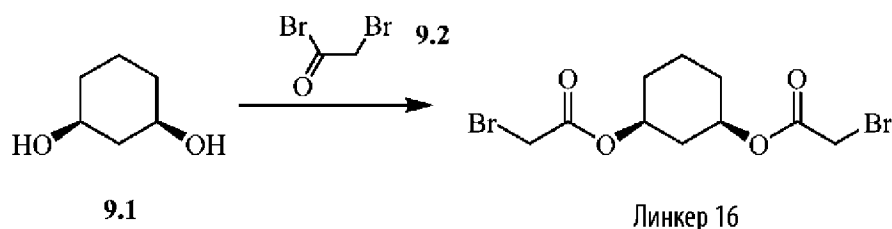


[370] К раствору соединения **8.1** (500 мг, 4,30 ммоль, 1 экв.) в дихлорметане (50 мл) добавляли пиридин (818 мг, 10,33 ммоль, 833,84 мкл, 2,4 экв.) одной порцией при 0 °С. После этого, раствор соединения **8.2** (1,91 г, 9,47 ммоль, 823,92 мкл, 2,2 экв.) в дихлорметане (50 мл) добавляли к смеси по каплям при 0 °С. По окончании добавления реакционную смесь перемешивали при 20 °С в течение 2 ч. ТСХ (петролейный

эфир/этилацетат = 0/1) показала, что соединение **8.1** было полностью израсходовано ($R_f = 0,35$); новые пятна не появлялись. Реакционную смесь разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали EtOAc (30 мл x 3). Объединенные органические фазы осушали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток подвергали очистке методом колоночной хроматографии (SiO_2 , петролейный эфир/этилацетат = от 30/1 до примерно 20/1), получая **Линкер 15b** (120 мг, 326,00 мкмоль, выход 7,57%, чистота 97,2633% методом ГХ) в виде бесцветной маслянистой жидкости. ^1H ЯМР (400 МГц CDCl_3): δ 4,94 (шир.с, 2H), 3,84 (с, 4H), 1,96-1,83 (м, 4H), 1,82-1,70 (м, 4H).

Пример 9 - Получение соединений, пригодных для сшивания пептидов

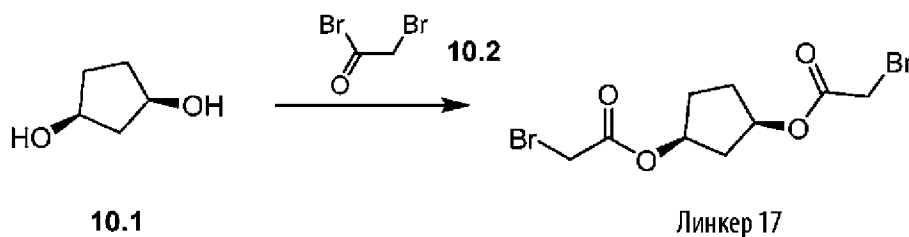
[371] Схема Е-8



[372] К раствору соединения **9.1** (500 мг, 4,30 ммоль, 1 экв.) в дихлорметане (50 мл) добавляли пиридин (818 мг, 10,33 ммоль, 833,84 мкл, 2,4 экв.) одной порцией при 0 °С. После этого, раствор соединения **9.2** (1,91 г, 9,47 ммоль, 823,92 мкл, 2,2 экв.) в дихлорметане (50 мл) добавляли к смеси по каплям при 0 °С. По окончании добавления реакционную смесь перемешивали при 20 °С в течение 2 ч. ТСХ (петролейный эфир/этилацетат = 0/1) показала, что соединение **9.1** было израсходовано ($R_f = 0,31$); новые пятна не появлялись. Реакционную смесь разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали EtOAc (30 мл x 3). Объединенные органические фазы осушали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток подвергали очистке методом колоночной хроматографии (SiO_2 , петролейный эфир/этилацетат = от 30/1 до примерно 20/1), получая **Линкер 16** (120 мг, 322,01 мкмоль, выход 7,48%, чистота 96,0736% методом ГХ) в виде бесцветной маслянистой жидкости. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 4,91-4,77 (м, 2H), 3,81 (с, 4H), 2,32-2,25 (м, 1H), 2,02-1,86 (м, 3H), 1,67-1,57 (м, 1H), 1,46-1,33 (м, 3H).

Пример 10 - Получение соединений, пригодных для сшивания пептидов

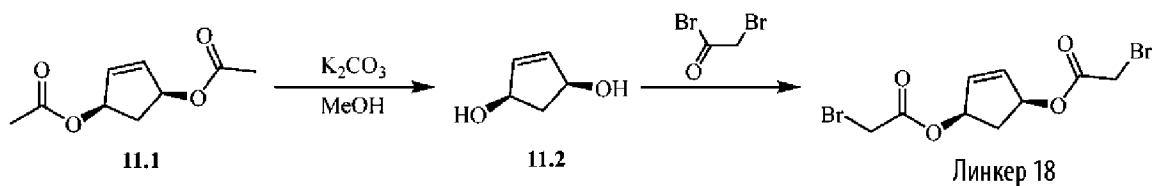
[373] Схема Е-9



[374] К раствору соединения **10.1** (500 мг, 4,90 ммоль, 1 экв.) в дихлорметане (100 мл) добавляли пиридин (930 мг, 11,75 ммоль, 948,36 мкл, 2,4 экв.) одной порцией при 0 °С. После этого, раствор соединения **10.2** (2,17 г, 10,77 ммоль, 937,08 мкл, 2,2 экв.) в дихлорметане (20 мл) добавляли к смеси по каплям при 0 °С. По окончании добавления реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. ТСХ (петролейный эфир/этилацетат = 0/1) и ЖХ-МС показали, что соединение **10.1** было израсходовано ($R_f = 0,35$), новые пятна не появились. Реакционную смесь разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали EtOAc (30 мл x 3). Объединенные органические фазы сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая 1,5 остатка. Остаток (500 мг) подвергали очистке методом колоночной хроматографии (SiO_2 , петролейный эфир/этилацетат = от 100/0 до примерно 5/1), получая **Линкер 17** (120 мг, 334,18 мкмоль, выход 22,9%, чистота 95,7976% методом ГХ) в виде светло-желтой маслянистой жидкости. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 5,22 (шир.с, 2H), 3,82 (с, 4H), 2,36-2,24 (м, 1H), 2,09-1,93 (м, 5H)

Пример 11 - Получение соединений, пригодных для сшивания пептидов

[375] Схема E-10



[376] К раствору соединения **11.1** (1,00 г, 5,43 ммоль, 1,00 экв.) в MeOH (10,0 мл) добавляли K_2CO_3 (2,00 г, 14,47 ммоль, 2,67 экв.) одной порцией при 0 °С. По окончании добавления реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при 0 °С. ТСХ (петролейный эфир/этилацетат = 5/1) показала, что соединение **11.1** было израсходовано ($R_f = 0,08$), и появилось новое пятно ($R_f = 0,63$). Смесь фильтровали и фильтрат концентрировали под вакуумом, получая соединение **11.2** (800 мг, неочищенное) в виде маслянистой жидкости желтого цвета. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 5,65 (с, 2H), 4,25 (дд, $J = 2,6, 6,9$ Гц, 2H), 2,16 (тд, $J = 6,9, 13,5$ Гц, 1H), 1,34 (шир.д, $J = 13,6$ Гц, 1H).

[377] К раствору соединения **11.2** (600 мг, 5,99 ммоль, 1,00 экв.) в дихлорметане (80

мл) добавляли пиридин (1,14 г, 14,38 ммоль, 1,16 мл, 2,40 экв.) и DMAP (22,0 мг, 179,79 мкмоль, 0,03 экв.) одной порцией при 0 °С. После этого, раствор 2-бромацетилбромида (2,66 г, 13,18 ммоль, 1,15 мл, 2,20 экв.) в дихлорметане (12,0 мл) добавляли к смеси по каплям при примерно 0-5 °С. По окончании добавления реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 20 °С. ТСХ (петролейный эфир/этилацетат = 5/1) показала, что соединение **11.2** было израсходовано ($R_f = 0,08$), и появилось новое пятно ($R_f = 0,63$). Добавляли в реакцию HCl (1N, 40,0 мл) порциями при 0 °С. Смесь разделяли и органический слой промывали NaHCO₃ (20,0 мл x 3, насыщенный). Органический слой осушали над Na₂SO₄ и фильтровали. Фильтрат концентрировали, получая неочищенный **Линкер 18** (1,50 г) в виде маслянистой жидкости светло-желтого цвета.

[378] Неочищенный Линкер 18 (200 мг) подвергали очистке методом хроматографии на силикагеле (петролейный эфир/этилацетат = от 100/0 до примерно 10/1), получая Линкер 18 в виде маслянистой жидкости светло-желтого цвета (120 мг, 344,01 мкмоль, выход 23,4%, чистота 97,4727%). ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d): δ 6,23-6,15 (м, 2H), 5,67-5,58 (м, 2H), 3,85 (с, 4H), 2,93 (тд, J = 7,5, 15,2 Гц, 1H), 1,85 (тд, J = 3,6, 15,1 Гц, 1H).

Пример 12 - Сшивание пептидов с применением определенных соединений

[379] Как описано в данном документе, предлагаемые агенты, например, соединения R^x-L^{s2}-R^x или их соли, или формулы **R-I**, или их соли, могут применяться для получения сшитых пептидов, в частности, путем сшивания цистеинами. В одном наборе препарата (i, i+4) и (i, i+7) пептидные связывающиеся и несвязывающиеся с бета-катенином агенты были синтезированы с применением методов твердофазного пептидного синтеза и очистки, хорошо известных специалисту в данной области. Такие пептиды включают производные xStAx41, пептида, описанного, например, в Grossman et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(44), 174942-17947. Определяли аффинность связывания этих пептидов, сшитых путем метатезиса с рутением. Неприродные аминокислоты этих пептидов были заменены на остаток цистеина и сшиты **Линкерами 1-9**.

[380] После сшивания (i, i+4) и (i, i+7) пептидных связывающихся и несвязывающихся с бета-катенином агентов **Линкерами 1-9**, эффективность сшивания оценивали с помощью ЖХ-МС. Эффективность сшивания пептидов определяли путем сравнения соотношений интегральной площади пиков A₂₈₀ между сшитыми и несшитыми пептидами. Этот расчет описывается уравнением:

% эффективности

$$= \frac{\text{Площадь}_{\text{сшитые}}}{\text{Площадь}_{\text{сшитые}} + \text{Площадь}_{\text{несшитые}}}$$

[381] Выбирали четыре момента времени для определения эффективности сшивания: 10 мин, 30 мин, 1 ч и 2 ч. Были выбраны два пептида - один (i, i+4) и один (i, i+7). Реакцию в заданные моменты времени гасили добавлением к образцам трифторуксусной кислоты (TFA) до конечной концентрации TFA, равной 1% (об./об.). Затем снимали показания методом ЖХ-МС. Программное обеспечение Agilent позволяет определять интегральную площадь пиков. Затем площади конкретных пиков A_{280} были вставлены в R-скрипт, который создает графики, позволяющие сравнивать эффективности сшивания в заданные моменты времени для всех линкеров в двух отдельных пептидах (Фиг. 8).

[382] Как продемонстрировано, предложенные соединения можно применять для сшивания в различных положениях, например, (i, i+4), (i, i+7) и т.д. В некоторых вариантах реализации предложенные соединения обеспечивают быстрое сшивание. В некоторых вариантах реализации предлагаемые соединения обеспечивают высокий процент сшивания. В некоторых вариантах реализации предлагаемые соединения обеспечивают аналогичную эффективность образования сшивок в разных положениях, например, (i, i+4), (i, i+7) и т.д. В некоторых вариантах реализации можно применять более высокое отношение линкера к пептиду, и при этом не образуются побочные продукты из двух линкеров, связанных с одним пептидом. В некоторых вариантах реализации единственными обнаруженными существенными побочными продуктами были образующиеся в результате нуклеофильного замещения другими боковыми цепями пептида. В некоторых вариантах реализации таких побочных реакций можно избежать, добавляя DTT (дитиотреитол) в качестве вещества-гасителя. В некоторых вариантах реализации реакции сшивания доходят до почти полного завершения, и очистка после сшивания не проводилась.

Пример 13 - Сшитые цистеинами пептиды взаимодействуют с мишенями

[383] Как показано в данном документе, предложенные сшитые цистеином пептиды взаимодействуют со своими мишенями. В одной процедуре (i, i+4) и (i, i+7) пептидные агенты, связывающиеся и несвязывающиеся с бета-катенином, сшитые **Линкерами 1-9**, оценивали на связывание с бета-катенином с применением анализа поляризации флуоресценции (FP). Буфер для поляризации флуоресценции содержал 50 мМ Трис, pH

8,0, 250 mM NaCl, 2% (об./об.) глицерина, 0,5 mM трис-2-карбоксиэтилфосфина (ТСЕР), 0,5 mM ЭДТА, 0,02% (мас./об.) азида натрия. Растворы замороженных пептидов серийно разводили на планшете LoBind Eppendorf 500 мкл.

[384] В каждую лунку планшета добавляли смесь зондов, содержащую пептид с известной константой связывания. Смесь мишень/зонд готовили путем добавления буфера, затем мишени, а затем зонда. Показания флуоресценции каждой лунки определяли с помощью SpectramaxM5. Был составлен R-скрипт для считывания данных и вычисления соответствующих данных поляризации флуоресценции (FP). Этот R-скрипт использовал необработанные показания флуоресценции для каждой лунки и нормировал их, чтобы позволить осуществлять сравнение всех образцов. Затем показания наносятся на график и интерпретируют с применением следующего уравнения:

$$f_b = \frac{c^n}{K_D + c^n}$$

(Фиг. 9 и Фиг. 10). Это уравнение отображает уравнение Хилла, используемое для интерпретации аффинностей связывания тестируемых пептидов. f_b обозначает долю пептида, связанного с мишенью, c - концентрацию пептида, n - коэффициент Хилла, и K_D - кажущуюся константу диссоциации. Затем значение K_D используют для сравнения аффинностей связывания отдельных пептидов. Она выражается в единицах концентрации и означает концентрацию субстрата, необходимую для получения доли связанной мишени, равной 0,5.

Пример 14 - Экспрессия и сшивание пептидов

[385] Помимо прочего, данное изобретение предлагает технологии для идентификации и конструирования полезных аминокислотных последовательностей и сшитых пептидов. В одном примере были получены отображаемые на фаге пептиды или библиотеки пептидов (технологии, используемые для конструирования таких библиотек, приведены, например, в Sidhu et al., Methods Enzymol. 2000; 328: 333-363; или Chen and Heinis, Methods Mol Biol., 2015; 1248: 119-137). Олигонуклеотиды, кодирующие отдельные клоны или вырожденные библиотеки, собирали в фаговый или фагмидный вектор, такой как fADL, pADL или M13KE, с применением стандартных методов молекулярной биологии и трансформировали в подходящего хозяина, такого как штамм *E. coli* ER2738 или TG1, с помощью электропорации. Фаговые частицы амплифицировали экспансией культуры *E. coli* в течение 5 ч в среде Лурия-Бертрани (LB) при встряхивании

при 37 °C, собирали осадок клеток *E. coli* центрифугированием при 5000 x g, осаждением фаговых частиц из супернатанта добавлением 1/5 объема 20% (мас./об.) полиэтиленгликоля 8000, 2,5 М NaCl, с последующим инкубированием в течение ночи при 4 °C, центрифугированием при 5000 x g, и ресуспендированием в забуференном Трис физиологическом растворе (TBS). Фаговые частицы могут быть дополнительно очищены путем повторения стадий осаждения, сбора осадка центрифугированием и ресуспендирования. Отображаемые фагом пептиды или библиотеки пептидов подвергали ковалентному сшиванию (“сшитые”) путем разведения раствора фаговых частиц в TBS до значения оптической плотности OD600, равного 1,0, и добавления дитиотреитола до концентрации 1 мМ, с последующим диализом против 100 объемов 20 мМ NH₄CO₃, 2 мМ ЭДТА, pH ~8, в течение 30-60 мин, после чего добавляли диализированный фаг к раствору сшивающего агента, приготовленного в 20 мМ NH₄CO₃, 2 мМ ЭДТА, pH ~8 (конечная концентрация сшивающего агента составляет 200 мкМ) и инкубировали в течение 2 ч при 32 °C. Избыток сшивающего агента удаляли сначала центрифугированием при 5000 x g, с последующим добавлением дитиотреитола до концентрации 0,25 мМ с инкубированием в течение 10 мин, и затем добавлением йодацетамида до концентрации 0,75 мМ с инкубированием в течение еще 10 мин. Фаговые частицы дополнительно очищали, повторяя стадии осаждения, отделения осадка центрифугированием и ресуспендирования, описанные выше, для очистки из культуры *E. coli*.

[386] На Фиг. 11 представлены данные масс-спектрометрии для сшивания двух репрезентативных пептидных клонов на фаге. На панели А **Линкер 9** применяли для сшивания пептида с последовательностью ACILDCHIQR, слитой с белком оболочки фага рIII. На панели В, **Линкер 7** применяли для сшивания пептида с последовательностью ACILDANICR, слитой с белком оболочки рIII. После вышеописанного протокола сшивания на фаге, фаговые частицы смешивали с 2 мкг трипсина (из поджелудочной железы свиньи), инкубировали в течение 1 ч при 37 °C, и затем анализировали на приборе Thermo Q-Exactive Plus, оснащенном системой ЖХ UltiMate 3000 LC и колонкой Phenomenex Aeris C18, используя 4 мин градиента 5-100% ацетонитрила в воде, содержащей 0,1% муравьиной кислоты. Следы экстрагированных ионов показывают присутствие сшитых и трипсинизированных продуктов с MB (MW) = 1336,643 (панель А, наблюдаемая масса иона (M+3H)/3 равна 446,555) и MB = 1301,601 (панель В, наблюдаемая масса иона (M+3H)/3 равна 434,874).

Пример 15 - Получение библиотеки сшитых пептидов и идентификация полезных последовательностей и сшитых пептидов

[387] Для получения пептидных библиотек в соответствии с данным изобретением можно применять множество технологий. В одной процедуре, отображаемые на фаге пептиды или библиотеки пептидов получали с применением стандартных методов, например, как описано выше. В некоторых предпочтительных вариантах реализации библиотека содержит два остатка цистеина, которые разделены 3 или 6 аминокислотами между двумя остатками цистеина (расстояние $i, i + 4$ или $i, i + 7$). В некоторых вариантах реализации библиотека содержит два остатка цистеина, которые разделены 2, 5, 8, 10, 11 или 12 остатками между двумя остатками цистеина. В некоторых вариантах реализации библиотека содержит несколько пар цистеинов, причем каждая пара разделена 3 или 6 аминокислотами между парой из двух остатков цистеина. Некоторые типовые проекты библиотек перечислены ниже:

- a) XXXXXCXXXXXXXXCXXXXX
- b) XXXXXCXXAAXXCXXXXX
- c) XXXXXCXXXCXXXXX
- d) ADPAXXXCXXXXXXXXCXXX
- e) ADPAXXXCXXAAXXCXXX
- f) ADPAXXXCXXXCXXX
- g) PXXXCXXXXXXXXCXXX
- h) PXXXCXXAAXXCXXX
- i) PXXXCXXXCXXX.

[388] В некоторых вариантах реализации «X» представляет собой положение, в котором в конструкции библиотеки могут находиться несколько аминокислот, например, это рандомизированное положение. Как понятно специалистам в данной области техники, включение рандомизированных положений может осуществляться путем кодирования вырожденного кодона в олигонуклеотидном праймере, используемым для генерирования библиотеки, например, NNN или NNK, где N = A, T, C, G и K = T, G. Альтернативно, рандомизированные положения могут быть включены путем применения смесей тримерных фосфорамидитов, например, поставляемых фирмой Glen research, причем определенную смесь тримерных кодонов, которые кодируют соответствующую определенную смесь аминокислот, включают в олигонуклеотидный праймер, используемый для получения библиотеки. Например, библиотека может быть создана с применением смеси всех 20 природных аминокислот или, альтернативно, с применением какого-либо подмножества всех 20 природных аминокислот (например, A, D, E, F, H, I, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y и т.д.). В некоторых вариантах реализации, неприродные аминокислоты также могут быть включены с применением различных доступных

технологий.

[389] Библиотеки могут содержать фиксированные или подмножество предпочтительных аминокислот в последовательности для обеспечения желаемого свойства и/или активности, например, в некоторых вариантах реализации, благоприятствующих конформации альфа-спирали. Например, включение остатков аланина в определенных положениях в середине пептида (например, конструкции библиотек b), e) и h), описанные выше), пролина на N-конце (например, конструкции библиотек g), h), i) выше) или аспарагиновой кислоты, а за ней пролина на N-конце (например, конструкции библиотек d), e), f) в приведенном выше списке). Олигонуклеотиды, кодирующие эти библиотеки, можно собрать в фаговый или фагмидный вектор и амплифицировать и очистить с применением ряда технологий. Размеры библиотеки фагов могут варьироваться от 10^5 уникальных членов до 10^{10} или даже более уникальных членов. Обычно размер составляет 10^8 уникальных членов. Разнообразие библиотеки можно определить, например, титрованием фаговых трансформаций с применением стандартных методов. Библиотеки можно модифицировать с помощью сшивающих агентов для формирования пептидных сшивок.

[390] В следующих таблицах приведены некоторые репрезентативные клоны, полученные из двух конструкций библиотек, перечисленных выше. Эти клоны секвенировали путем высевания подмножества библиотеки после трансформации, амплификации и выделения фага, как описано выше, и секвенирования непосредственно из фага с применением праймера 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'. Разнообразие конструкции библиотеки f) составляло $6,2 \times 10^8$ уникальных трансформантов и разнообразие конструкции библиотеки e) составляло $6,5 \times 10^8$ уникальных трансформантов.

Библиотека (f)	Последовательность
Клон 1	ADPASVYCEMVCWTF
Клон 2	ADPALHSCHWMCAWQ
Клон 3	ADPAFMQCHNTCYTT
Клон 4	ADPAWEICEVNCFQS
Клон 5	ADPARMACQFVCEVF
Клон 6	ADPATWSCESMCWYE
Библиотека (e)	Последовательность
Клон 1	ADPAQIFCDMAAARCMEI
Клон 2	ADPAMQTCTNAALLCQQQ
Клон 3	ADPAEFVCMADAADTCDME

Клон 4	ADPANLICWDAAVACYWI
Клон 5	ADPARHFCQLAAHLCQWY
Клон 6	ADPASYACVRAAFSCDYI

Пример 16 - Дополнительные библиотеки пептидов и их применение

[391] Другие примерные конструкции библиотек включают, без ограничений, библиотеки, основанные на скаффолде на основе «РYY»:

j) AGPAKPEAPGEDASPXELXXYYXXLXXYLXXVA,

где «X» представляет собой положение, в котором в конструкции библиотеки могут находиться несколько аминокислот, например, это рандомизированное положение, как описано выше. В следующих таблицах представлены репрезентативные клоны, полученные из указанной выше библиотеки. Эти клоны секвенировали, как описано в Примере 15. Разнообразие библиотеки j) составляло $2,6 \times 10^8$ уникальных трансформантов.

Библиотека (j)	Последовательность
Матрица	AGPAKPEAPGEDASPXELXXYYXXLXXYLXXVAGGS
Клон 1	AGPAKPEAPGEDASPTELRNYYHNLTMYLHMOVAGGS
Клон 2	AGPAKPEAPGEDASPWELQNYYLSLQNYLYIVAGGS
Клон 3	AGPAKPEAPGEDASPMELTRYYSQLMEYLATVAGGS
Клон 4	AGPAKPEAPGEDASPFELHMYQNLIFYLPAVAGGS
Клон 5	AGPAKPEAPGEDASPFELQFYNYLIDYLDVAGGS

Пример 17 - Примерные технологии скрининга библиотек

[392] Для скрининга предлагаемых библиотек могут применяться различные технологии. В одном примере скрининг фаговых библиотек против биомолекул-мишеней проводят с применением известных способов (например, Sidhu et al., Methods Enzymol. 2000; 328: 333-363; Chen and Heinis, Methods Mol Biol., 2015; 1248: 119-137 и т.д.) в соответствии с данным изобретением. Примерный протокол выглядит следующим образом. Фаговую библиотеку, имеющую 100-кратное превышение представленности, добавляют к буферу, содержащему 1X TBS, 1 mM MgCl₂, 1% (мас./об.) BSA (бычий сывороточный альбумин), 0,1% (об./об.) Твин-20, 0,02% (мас./об.) азида натрия, 5% (мас./об.) обезжиренного молока, затем смешивают с магнитными шариками, несущими белка-мишени (например, Thermo Fisher Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown или Dynabeads MyOne Streptavidin T1). После 1 ч инкубации шарики отделяют от фага для удаления членов фаговой библиотеки, которые неспецифически связываются с

шариками. Затем биомолекулу-мишень, представляющую интерес, присоединяют к магнитным шарикам того же типа с помощью стандартных методов аффинного захвата (например, меченный гексагистидином белок с шариками, аффинными к никелю или кобальту (IMAC), меченный биотином белок с шариками со стрептавидином, или шарики с анти-FLAG антителом). Затем полученные шарики смешивают с библиотекой фагов и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре с последующей повторной промывкой для удаления несвязавшегося фага. Полученные шарики, которые содержат биомолекулу-мишень и связанный фаг, нагревают до 95 °C в буфере, содержащем 25 mM Трис pH 8, 50 mM NaCl, 0,5% (об./об.) Твин-20 для диссоциации ДНК фага. Полученную ДНК затем секвенируют (подробное описание приведено в последующих примерах).

[393] Множественные скрининги могут проводиться параллельно для оценки специфичности, активности или механизма связывания, например, путем проведения скрининга с другими биомолекулами-мишенями, иммобилизованными на шариках, путем скрининга шариков, не несущих мишени, или путем скрининга шариков с иммобилизованной определенной мишенью в присутствии известного агента, связывающегося с этим белком, и без него. Различия в силе связывания, оцениваемые с применением метода введения контрольного зонда («spike-in»), описанного ниже, используются для определения специфичности связывания пептида/пептидного кластера или для прогнозирования сайта связывания пептида на белке-мишени.

Пример 18 - Дополнительные технологии скрининга

[394] Скрининг предложенных библиотек, например, библиотек фаговых пептидов, против клеток или тканевых мишеней может быть проведен с применением различных методов (например, описанных, например, в Pasqualini and Ruoslahti, Nature (1996); Ivanenkov et al., Biochimica et Biophysica Acta 1448 (1999); Rangel et al., nature protocols Vol.8 No.10 (2013) и т.д.). В некоторых вариантах реализации контрольные скрининги могут проводиться параллельно для оценки специфичности или активности связывания, например, путем выделения других типов тканей в дополнение к ткани, представляющей интерес, или скрининга альтернативных клеточных линий или пустых лунок для культур тканей.

Пример 19 - Высокопроизводительное секвенирование при скрининге и обработке данных

[395] В некоторых вариантах реализации, как описано в данном документе, пептид связан с идентификатором, который можно применять для идентификации пептида во время скрининга. В некоторых вариантах реализации идентификатор представляет собой

нуклеиновую кислоту, например, содержащую последовательность, кодирующую пептид, или ее часть, достаточную для идентификации пептида. Например, в некоторых вариантах реализации библиотека представляет собой библиотеку пептидов, отображаемых на фаге, и пептид можно идентифицировать по последовательности нуклеиновой кислоты, которая может кодировать указанный пептид. В некоторых вариантах реализации фаговую ДНК, полученную в результате скринингов, секвенировали с применением методов секвенирования следующего поколения и транслировали в пептидные последовательности для определения относительной численности членов фаговой библиотеки, которые связывались с обычно иммобилизованной мишенью, представляющей интерес (например, биомолекулой, клеткой, тканью и т.д.). Последовательности, которые были селективными к представляющей интерес мишени, были идентифицированы путем сравнения результатов подсчета для последовательностей в скринингах для мишени с результатами подсчета для последовательностей в скринингах для контролей, таких как пустые шарики, шарики, содержащие другие мишени, или альтернативные типы клеток или тканей. Последовательности, которые были идентифицированы с помощью этого метода, дополнительно анализировали для выявления групп родственных последовательностей («семейств» или «кластеров»).

[396] Перед идентификацией последовательностей-кандидатов, все результаты подсчетов для последовательностей необязательно нормируются на основе одного или нескольких внутренних стандартов (например, путем добавления последовательности контрольного зонда (“spike-in”) в каждый образец, подвергаемый скринингу или секвенированию, после диссоциации фаговой ДНК, как описано выше, но до ПЦР и секвенирования). Нормирование предусматривает линейное масштабирование результатов подсчетов для каждой последовательности в образце для скрининга таким образом, чтобы результаты подсчетов для последовательности внутреннего стандарта соответствовали количеству фаговых частиц внутреннего стандарта, добавленных в образец. Помимо прочего, так можно откорректировать результаты подсчетов для последовательности, чтобы они представляли собой абсолютное количество элюированных фагов с данной последовательностью, а не числом показаний для этой последовательности.

[397] Последовательности могут быть ранжированы по кратности их обогащения в скринингах с представляющей интерес мишенью по сравнению с профилем кратности обогащения при ряде контрольных условий скрининга (например, буферные условия, различные биомолекулы, клетки и ткани-мишени, различные концентрации реагентов и

т.д.) или по общему количеству. Если был проведен скрининг для некоторого диапазона концентраций мишени, то может быть вычислена эффективная IC50 для каждой последовательности и применена для ранжирования. Последовательности с наивысшим рейтингом могут рассматриваться как препараты-кандидаты.

[398] В качестве примера на Фиг. 12 показан анализ кластеров последовательностей, идентифицированных при скрининге против бета-катенина с применением комбинации метода добавления контрольного зонда и добавления известного конкурента к «сайту связывания аксина/TCF (Т-клеточного фактора)» бета-катенина для определения влияния добавления конкурента на сигнал связывания кластера.

[399] Последовательности с наивысшим рейтингом могут дополнительно быть кластеризованы для идентификации семейств последовательностей. Попарные расстояния между всеми последовательностями-кандидатами могут быть вычислены с применением любого из множества показателей расстояния между последовательностями, включая

$$\text{расстояние} = \left(1 - \frac{\text{балл}_{ij}}{\text{балл}_{ii}}\right) \left(1 - \frac{\text{балл}_{ij}}{\text{балл}_{jj}}\right),$$

где балл_{ij} - балльная оценка выравнивания между последовательностями i и j . Оценки выравнивания могут быть вычислены с применением стандартных матриц оценки сходства последовательностей (например, матриц BLOSUM и PAM и т.д.). После получения матрицы попарных расстояний последовательностей, последовательности могут быть кластеризованы с применением иерархической кластеризации, кластеризации k -средних или любого другого метода кластеризации. Семейства последовательностей, представляющих основной мотив последовательности, могут быть затем идентифицированы по полученным кластерам. Последовательности, которые не попадают в кластеры схожих последовательностей, могут представлять ложноположительные результаты скрининга, в то время как последовательности, попадающие в кластеры со многими похожими последовательностями, имеют общий мотив последовательности, лежащий в основе этого кластера и, таким образом, для них с большей степенью вероятности будет подтверждено связывание с мишенями, представляющими интерес, при дальнейшем тестировании.

[400] Отдельные последовательности или группы последовательностей в кластере или семействе также могут быть исследованы на предмет их специфичности по отношению к представляющей интерес мишени. Эти последовательности можно исследовать в скринингах с другими мишенями, используя ту же библиотеку, либо в рамках одного цикла секвенирования, либо из цикла скрининга с отдельным секвенированием. Последовательности или семейства последовательностей, которые

демонстрируют увеличение количественных показателей между скринингом контролей и скринингом против других мишеней, могут проявлять неспецифическое связывание и потенциально могут быть лишены приоритета в пользу последовательностей, которые не показывают значительной разницы. Последовательности и семейства последовательностей могут быть исследованы на предмет их специфичности на любом этапе процесса определения приоритета попаданий, в том числе перед кластеризацией, так чтобы последовательности, не соответствующие заданному условию специфичности, могли быть исключены из дальнейшего анализа. Кроме того, если заданный профиль специфичности является желательным для набора гомологичных белков, то этот профиль специфичности можно применять для определения приоритетов последовательностей и семейств до или после кластеризации.

[401] В одном варианте реализации результаты подсчета для последовательностей нормируются на основе известного количества добавляемого контрольного (“spike-in”) фага, и последовательности ранжируются по кратности увеличения их количества в присутствии биомолекулы-мишени по сравнению с контрольным образцом. В некоторых вариантах реализации, попарные расстояния между 3000 верхних ранжированных последовательностей вычисляются с применением показателя расстояния, описанного выше, и оценочной матрицы выравнивания последовательностей РАМ70. Иерархическая кластеризация используется для кластеризации последовательностей, и 50 пороговых значений расстояния выбираются единообразно из набора всех высот внутренних узлов в дендрограмме. Кластеры определяются с применением всех пороговых значений расстояния. В то же время, 3000 последовательностей выбирают случайным образом и подвергают такой же иерархической кластеризации. Эту процедуру повторяют 1000 раз, чтобы сгенерировать набор дендрограмм с нулевой гипотезой. Число и размер кластеров на каждом пороговом значении для последовательностей с наивысшим рангом сравнивают с распределением числа и размера кластеров на том же пороге во всех 1000 дендрограммах нулевых гипотез, чтобы вычислить эмпирическое р-значение как для порогового значения (число кластеров), так и для каждого кластера на этом пороге (размер кластера). Принимают во внимание только кластеры с р-значениями, меньшими или равными 0,05. Для каждого кластера могут быть сконструированы логотипы последовательностей, чтобы визуализировать лежащий в основе мотив последовательности и облегчить выбор пептидов-кандидатов. Кроме того, специфичность по отношению к мишени для каждого кластера проверяют вручную, ища значимую разницу между контрольным образцом для скрининга и образцами для скрининга других мишеней, и семейства, демонстрирующие отсутствие специфичности, исключаются из

дальнейшего рассмотрения. Указанный процесс повторяют для следующих 3000 ранжированных последовательностей, и так далее, пока ни один кластер не будет соответствовать критериям значимости.

Пример 20 - Библиотеки для дополнительных анализов

[402] В некоторых вариантах реализации результаты скрининга, например, информация о секвенировании, полученная из вышеупомянутых скринингов, могут применяться для подготовки «сфокусированных библиотек» или «библиотек оптимизации». Это можно сделать с применением такой же методологии построения библиотеки, как описанная выше, за исключением того, что в положениях, которые являются «рандомизированными», аминокислоты, дозволенные для каждого положения, будут ограничены на основе последовательностей в том же семействе или кластере последовательностей.

[403] Например, для каждого семейства последовательностей, идентифицированных в Примере 6, допустимые аминокислоты в каждом положении определяются как имеющие частоту выше порогового значения, например, 10%. Если ни одна из аминокислот не соответствует этому критерию, то все аминокислоты (или заранее определенное подмножество всех аминокислот) можно считать дозволенными. В некоторых вариантах реализации для каждого положения выбирается наиболее рестриктивный вырожденный кодон, который охватывает все дозволенные аминокислоты. Вместе набор вырожденных кодонов в каждом положении определяет библиотеку оптимизации. Затем размер библиотеки вычисляют на основе размера пространства последовательностей, кодируемого выбранными кодонами в каждом положении. Затем порог может быть изменен для создания библиотеки, размер которой соответствует некоторым заранее определенным критериям, например, самая большая библиотека имеет размер до 10^6 членов. Эти библиотеки могут быть изготовлены и подвергнуты скринингу таким образом, чтобы почти вся последовательность в пространстве последовательностей библиотеки присутствовала в количестве, достаточном для ее обнаружения при скрининге.

[404] Фокусированные библиотеки могут быть подвергнуты скринингу, секвенированию и анализу, как описано выше. В некоторых вариантах реализации данное изобретение предусматривает почти полную выборку пространства последовательностей вокруг каждого семейства последовательностей-кандидатов, а фокусированные библиотеки могут предоставлять подробную информацию о предпочтении аминокислот в каждом положении, включая переносимые и непереносимые аминокислоты, а также

количественные эффекты влияния различных аминокислот на селективность по сравнению с контрольными образцами.

Пример 21 - Идентифицированные пептиды связываются с мишенями

[405] В некоторых вариантах реализации предлагаемые технологии обеспечивают пептиды, аминокислотные последовательности которых сильно отличаются от известных природных аминокислотных последовательностей, которые связываются с мишенью. В некоторых вариантах реализации предусматриваемые технологии могут обеспечивать пептиды для мишеней, не имеющих известных связывающих агентов. В одном примере коллекцию сшитых цистеином пептидов подвергли скринингу на бета-катенин. Библиотека с 10 случайными сайтами (ADPAXXXCXXAAXXCXXX) была сшита **Линкером 7**, и было достигнуто обогащение определенных последовательностей (Фиг. 12, 13 и 14). Из этих последовательностей, Соединения 1 и 2 оценивали каждое на предмет их связывания с бета-катенином с применением системы Biacore (Фиг. 15). Приблизительно 6 нмоль высушенного пептида, разведенного в буфере (50 мМ Трис, pH 8,0, 300 мМ NaCl, 2% (об./об.) глицерина, 0,5 мМ ТСЕР, 0,5 мМ ЭДТА, 0,005% (об./об.) Твин-20, 1 мг/мл карбоксиметилдекстрана (CM Dextran), 0,02% (мас./об.) азида натрия) и проводят количественное определение по оптическому поглощению при 280 нм. Каждый пептид анализировали на Biacore X100 с применением набора Biacore Biotin CAPture (GE Healthcare) и биотинилированного бета-катенина; результаты были проанализированы с применением прикладной программы Biacore X100 Evaluation (Фиг. 15).

Пример 22 - Различные сшитые пептиды связываются с белком-мишенью

[406] Был получен и оценен ряд пептидов с применением описанных в данном документе технологий. Некоторые полезные технологии описаны ниже в качестве примера.

[407] Синтез и очистка пептида: Пептиды были синтезированы путем твердофазной сборки на смоле ProTide (0,65 ммоль/г) с применением Fmoc-стратегии. Все связывания проводили с четырехкратным избытком аминокислот и связывающих реагентов, таких как HATU и диизопропилэтиламин (DIPEA). Пептиды выделяли со смолы путем обработки коктейля для отщепления, состоящего из воды (2,5% (об./об.)), триизопропилсилана (2,5% (об./об.)) и трифторуксусной кислоты (95% (об./об.)), в течение 1,5 ч. Пептиды осаждали добавлением ледяного эфира.

[408] Сшивание (сшивка): раствор лиофилизированного сырого пептида (~3-5 мг/мл) растворяли в 50% ацетонитриле/воде. Раствор обрабатывали

диизопропилэтиламино (~3 экв.) и встряхивали в течение 5 мин. Алкилирующий агент (например, Линкер 7) в ДМФ (1,1 экв.) добавляли к раствору и перемешивали при 37 °С в течение 30 мин. Реакцию гасили добавлением 2 экв. 1М дитиотреитола (DTT) для гашения оставшегося линкера. Сырую смесь подвергали очистке методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с применением колонки C18 и градиента растворителя А: H₂O, HCO₂H (0,1% (об./об.)); растворителя В: CH₃CN, HCO₂H (0,1 % (об./об.)). Доступны различные технологии для характеристики пептидов. В некоторых вариантах реализации пептиды характеризовали методом аналитической ВЭЖХ и масс-спектрометрией.

[409] Оценка пептида: В одном анализе для оценки связывания с бета-катенином, готовили растворы пептида в буфере (50 mM Трис pH 8,0, 250 mM NaCl, 2% глицерина, 0,5 mM ЭДТА, 0,02% мас./об. азида натрия) с применением 3-кратного серийного разбавления от 5 мкМ. Готовили раствор зонда (15 нМ полноразмерного β-катенина, 20 нМ FITC-меченный пептид аксин (Axin) в буфере ([FAM-PEG1-RRWPR(S5)ILD(S5)HVERRVWR] где два остатка S5 являются сшитыми, как описано в: Proc Natl Acad Sci US A. 2012 Oct. 30; 109(44): 17942-7)), и инкубировали в течение 5 минут, затем помещали по 40 мкл на лунку на черный полистирольный 384-луночный планшет (Corning). Добавляли в планшет равный объем титрованного пептида и инкубировали в защищенном от света месте в течение 15 минут перед считыванием. Считывание проводили на Spectramax M5 (Molecular Devices) в двух параллельных измерениях.

[410] Измерение LogD (логарифм коэффициента распределения): Значения LogD измеряли на приборе ВЭЖХ Agilent 1260 с УФ-детектором (254, 220 нм), с применением колонки Gemini NX C-18 50 x 3 мм (Phenomenex) с 6-минутным градиентом 0-100% подвижной фазы А) 50 mM ацетата аммония, pH 7,4, и В) ацетонитрила при 25 °С со скоростью потока 1 мл/мин и объемом впрыска 3-5 мкл. Смесь для калибровки C-18 была закуплена у фирмы Bio-mimetic Chromatography Ltd и применена для проведения калибровки, расчета значения CHI (хроматографический индекс гидрофобности), затем расчета CHI logD по уравнению: $CHI \log D = 0,0525 * CHI - 1,467$.

[411] Измерение LogK (логарифм фактора удерживания): Значения LogK были измерены на приборе ВЭЖХ Agilent 1260 с УФ-детектором (254 280 нм) с применением колонки IAM.PC.DD2 100 x 4,6 мм (Regis Technologies 1-774011-300) с 6,5 мин градиентом 0-90% В с подвижной фазой А 50 mM ацетата аммония, pH 7,4, и подвижной фазой В ацетонитрилом. Температура составляла 30 °С, скорость потока 1,5 мл/мин, и объем впрыска 3-5 мкл. Калибровочную смесь IAM закупали у фирмы Bio-mimetic Chromatography Ltd и применяли для проведения калибровки, расчета значения CHI IAM

(иммобилизованная искусственная мембрана), затем расчета $\log k_{IAM}$ по уравнению: $\log k_{IAM} = 0,046 * \text{CHI}_{IAM} + 0,42$.

[412] Данные некоторых измерений представлены ниже и на Фиг. 17. Как продемонстрировано в данном документе, определенные пептиды, например, содержащие цистеиновые сшивки из различных линкеров, могут эффективно связываться с бета-катенином (например, с EC_{50} не более 50, 100, 150, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 5000 или 10000 нМ).

Идентификатор*	Тип сшивки**	Последовательность	LogD	LogK	EC50 бета-катенина (нМ)
1	Линкер 7	ADPATHRCEWAALHCELV	0,57	1,3	5197
2	Линкер 7	ADPALWACEHAALICETQ	0,62	1,16	2802
3	Линкер 7	ADPAYEECILAANHCQTW	0,74	1,54	н.о.
4	Линкер 7	ADPALADCILAANMCQLW	1,24	1,78	5519
5	Линкер 7	ADPAHAECVLDYHICQIW	1,09	2,1	117
6	Линкер 7	ADPAQDHCILDTHICRIW	1	1,53	47
7	Линкер 7	ADPAEDECILNNHICRIW	0,82	2,39	14
8	Линкер 7	ADPAEDECILAANMCRWW	0,92	1,85	255
9	Линкер 7	ADPAEDDCILAANHCQWD	0,29	1,67	188
10	Линкер 7	ADPAQWHCEHAALICELD	0,39	1,98	417
11	Линкер 7	ADPARWQCEHAALLCELE	0,47	1,74	922
12	Линкер 7	ADPADWECEHAALICDAM	0,39	1,66	815
13	Линкер 7	ADPAYWLCSEHAALICEVE	0,8	1,75	456
14	Линкер 7	ADPAQWPCEHAALLCEIE	0,47	1,59	404
15		GPAKPEAPGEDASPDELHHYYQNLETYLYRVA	0,82	1,67	>10000
16		GPAKPEAPGEDASPDELIHYYNSLDEYLYEVA	0,53	1,67	>10000
17		GPAKPEAPGEDASPDELYHYYTHLEEYLYDVA	0,64		>10000
18		GPAKPEAPGEDASPDELMHYYTSLEDYLDHVP	0,52		>10000
19		GPAKPEAPGEDASPDELTYYYDELRDYLYSVA	0,82		>10000
20		GPAKPEAPGEDASPDELIFYYDHLSTRYLTQVA	0,91		>10000
21		GPAKPEAPGEDASPDELRMYHHELDNYLDQVA	0,44		>10000
22		GPAKPEAPGEDASPDELHTYYDTLYHYLTQVA	1,09	1,87	>10000
23		GPAKPEAPGEDASPDELYYYDDLRQYLTQVA	0,81		>10000
24		GPAKPEAPGEDASPTELYYYDHLTDYLDVVP	0,66		>10000
25		GPAKPEAPGEDASPNELYYYDELHYYLHDVA	0,59	1,68	>10000

Идентификатор*	Тип сшивки**	Последовательность	LogD	LogK	EC50 бета-катенина (нМ)
26		GPAKPEAPGEDAS PQELHDY YEILDNYLDWVA	0,87	1,81	>10000
27		GPAKPEAPGEDASPNELHYYYWELDSYLENVA	0,64	1,69	>10000
28		GPAKPEAPGEDASPEELYHYYWDLDDYLD RVA	0,62	1,68	>10000
29		GPAKPEAPGEDASPIELWEYYESLETYLDNVA	0,73	1,86	>10000
30		GPAKPEAPGEDASPLELNLYYLDLHDY LQQVA	0,98	1,69	>10000
31	Линкер 10	ADPATHRCEWAALHCELV	0,68	1,19	>10000
32	Линкер 11	ADPATHRCEWAALHCELV	0,61	1,34	5165
33	Линкер 12	ADPATHRCEWAALHCELV	0,68	1,4	5352
34	Линкер 13	ADPATHRCEWAALHCELV	0,63	1,32	4318
35	Линкер 15a	ADPATHRCEWAALHCELV	0,77	1,16	>10000
36	Линкер 15b	ADPATHRCEWAALHCELV	0,77	1,35	>10000
37	Линкер 16	ADPATHRCEWAALHCELV	0,84	1,34	>10000
38	Линкер 17	ADPATHRCEWAALHCELV	0,8	1,25	>10000
39	Линкер 18	ADPATHRCEWAALHCELV	0,75	1,27	>10000
40	Линкер 10	ADPALWACEHAALICETQ	0,73	1,12	9546
41	Линкер 11	ADPALWACEHAALICETQ	0,73	1,21	3024
42	Линкер 12	ADPALWACEHAALICETQ	0,84	1,3	4516
43	Линкер 13	ADPALWACEHAALICETQ	0,75	1,19	4593
44	Линкер 15a	ADPALWACEHAALICETQ	0,7	1,08	7334
45	Линкер 15b	ADPALWACEHAALICETQ	1,03	1,31	5569
46	Линкер 16	ADPALWACEHAALICETQ	0,94	1,24	5821
47	Линкер 17	ADPALWACEHAALICETQ	0,91	1,21	>10000
48	Линкер 18	ADPALWACEHAALICETQ	0,93	1,22	>10000

* Исходные последовательности для 15-30 (несшитые) - PYY.

** Линкерные агенты связывают два остатка цистеина (-S- заменяют отходящие группы, такие как -Br)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сшитый пептид, который содержит сшивку, имеющую структуру L^s , где:

L^s представляет собой $-L^{s1}-S-L^{s2}-S-L^{s3}-$;

L^{s1} и L^{s3} каждый независимо представляют собой L ;

L^{s2} представляет собой L и содержит по меньшей мере два $-C(O)-$; и

каждый L независимо представляет собой ковалентную связь или необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_{25} алифатическую группу, причем одно или несколько метиленовых звеньев алифатической группы необязательно и независимо замещены на $-C(R')_2-$, $-Cy-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')-$, $-C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$, $-C(O)S-$ или $-C(O)O-$;

каждый $-Cy-$ независимо представляет собой необязательно замещенную двухвалентную группу, выбранную из C_{3-20} циклоалифатического кольца, C_{6-20} арильного кольца, 5-20-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3-20-членного гетероциклического кольца, содержащего 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния;

каждый R' независимо представляет собой $-R$, $-C(O)R$, $-CO_2R$ или $-SO_2R$;

каждый R независимо представляет собой $-H$ или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-30} алифатической, C_{1-30} гетероалифатической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, C_{6-30} арильной, C_{6-30} арилалифатической, C_{6-30} арилгетероалифатической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, 5-30-членной гетероарильной, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3-30-членной гетероциклической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, или

две группы R , необязательно и независимо, вместе образуют ковалентную связь, или:

две или более групп R на одном и том же атоме, необязательно и независимо, вместе с указанным атомом образуют необязательно замещенное 3-30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее, помимо указанного атома, 0-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния; или две или более групп R на двух или нескольких атомах, необязательно и независимо, вместе с промежуточными атомами между ними, образуют необязательно замещенное 3-30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее,

в дополнение к промежуточным атомам, 0-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния.

2. Коллекция сшитых пептидов, каждый из которых независимо имеет аминокислотную последовательность, которая:

имеет длину в диапазоне от 6 до 32 аминокислотных остатков;

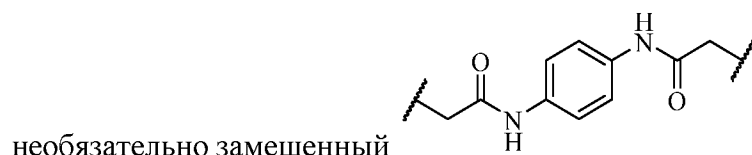
включает по меньшей мере одну пару остатков цистеина, ковалентно связанных друг с другом через линкер, имеющий структуру $-S-L^{s2}-S-$, где каждый S независимо представляет собой атом серы остатка цистеина; и

пара остатков цистеина независимо разделена 0-12 аминокислотными остатками.

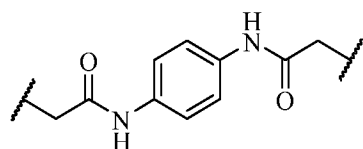
3. Коллекция по п. 2, содержащая по меньшей мере 1×10^4 , 1×10^5 или 1×10^6 уникальных сшитых пептидов.

4. Коллекция по любому из пп. 2-3, отличающаяся тем, что коллекция сшитых пептидов имеет длину в диапазоне 8-26 аминокислотных остатков.

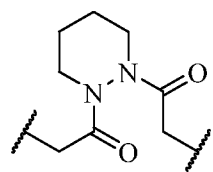
5. Коллекция по любому из пп. 2-4, отличающаяся тем, что L^{s2} представляет собой



6. Коллекция по любому из пп. 2-4, отличающаяся тем, что L^{s2} представлен структурой:



7. Коллекция по любому из пп. 2-4, отличающаяся тем, что L^{s2} представлен структурой:



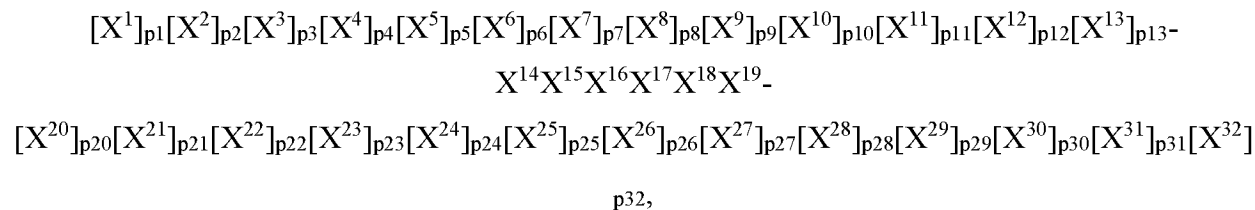
8. Коллекция по любому из пп. 2-7, отличающаяся тем, что остатки цистеина в паре разделены 3 аминокислотными остатками.

9. Коллекция по любому из пп. 2-7, отличающаяся тем, что остатки цистеина в паре разделены 6 аминокислотными остатками.

10. Коллекция по любому из пп. 2-9, отличающаяся тем, что каждый отдельный сшитый пептид в коллекции ковалентно связан с фаговой частицей.

11. Коллекция по любому из пп. 2-10, отличающаяся тем, что отдельные сшитые

пептиды в коллекции независимо друг от друга имеют структуру:



где:

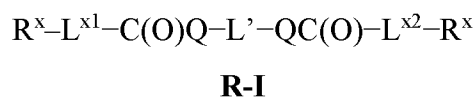
каждый из $p1, p2, p3, p4, p5, p6, p7, p8, p9, p10, p11, p12, p13, p20, p21, p22, p23, p24, p25, p26, p27, p28, p29, p30, p31, p32$ независимо равен 0 или 1;

каждый из X^1-X^{32} независимо представляет собой аминокислотный остаток; и

по меньшей мере два из X^1-X^{32} представляют собой пару остатков цистеина, ковалентно связанных друг с другом через линкер, имеющий структуру $-S-L^{s2}-S-$, где каждый S независимо представляет собой атом серы остатка цистеина, и при этом остатки цистеина в паре разделены 0-12 аминокислотными остатками.

12. Коллекция по п. 11, отличающаяся тем, что каждый из X^1-X^{32} независимо представляет собой выбранный случайным образом природный аминокислотный остаток.

13. Соединение, имеющее структуру формулы **R-I**:



или его соль, где:

каждый R^x независимо представляет собой уходящую группу;

каждый Q независимо выбран из ковалентной связи, $-N(R')$, $-O-$ и $-S-$;

каждый из L^{x1}, L^{x2} и L' независимо представляет собой ковалентную связь или необязательно замещенную двухвалентную C_1-C_{20} алифатическую группу, причем одно или несколько метиленовых звеньев алифатической группы необязательно и независимо замещены на $-C(R')_2-$, $-Cy-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')$, $-C(O)N(R')$, $-N(R')C(O)N(R')$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')$, $-C(O)S-$ или $-C(O)O-$;

каждый $-Cy-$ независимо представляет собой необязательно замещенную двухвалентную группу, выбранную из C_{3-20} циклоалифатического кольца, C_{6-20} арильного кольца, 5-20-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3-20-членного гетероциклического кольца, содержащего 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния;

каждый R' представляет собой $-R$, $-C(O)R$, $-CO_2R$ или $-SO_2R$;

каждый R независимо представляет собой $-H$ или необязательно замещенную группу,

выбранную из C_{1-30} алифатической, C_{1-30} гетероалифатической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, C_{6-30} арильной, C_{6-30} арилалифатической, C_{6-30} арилгетероалифатической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, 5-30-членной гетероарильной, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3-30-членной гетероциклической, содержащей 1-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, или

две группы R, необязательно и независимо, вместе образуют ковалентную связь; или

две или более групп R на одном и том же атоме, необязательно и независимо, вместе с указанным атомом образуют необязательно замещенное 3-30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее, помимо указанного атома, 0-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния; или

две или более групп R на двух или нескольких атомах, необязательно и независимо, вместе с промежуточными атомами между ними, образуют необязательно замещенное 3-30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, содержащее, в дополнение к промежуточным атомам, 0-10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния.

14. Соединение по п. 13, отличающееся тем, что каждый R^x независимо представляет собой -Br.

15. Соединение по п. 13, отличающееся тем, что каждый R^x независимо представляет собой -I.

16. Соединение по любому из пп. 13-15, отличающееся тем, что L^{x1} и L^{x2} представляют собой $-CH_2-$.

17. Соединение по любому из пп. 13-16, отличающееся тем, что Q представляет собой -NH-.

18. Соединение по любому из пп. 13-17, отличающееся тем, что L' представляет собой

необязательно замещенный 

19. Соединение, выбранное из Таблицы 1, 2 или 3.

20. Способ, включающий стадии:

экспрессии в клетке нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая:

имеет длину в диапазоне от 6 до 32 аминокислотных остатков; и

включает по меньшей мере одну пару остатков цистеина, причем остатки цистеина в паре

независимо разделены 0-12 аминокислотными остатками; и при этом нуклеиновая кислота кодирует слитый белок, который встроен в фаговую частицу; и выделения фаговых частиц из клетки и введения фаговых частиц в контакт со сшивающим агентом, имеющим структуру формулы **R-I**, так чтобы на фаговой частице образовывался сшитый вариант пептида, в котором пара остатков цистеина ковалентно связана через $-S-L^{s2}-S-$.

21. Способ, включающий стадии:

введения в контакт пептида, имеющего аминокислотную последовательность, которая:

имеет длину в диапазоне от 6 до 32 аминокислотных остатков; и

включает по меньшей мере одну пару остатков цистеина, причем остатки цистеина в паре независимо разделены 0-12 аминокислотными остатками;

со сшивающим агентом, так чтобы между остатками цистеина образовывалась сшивка по меньшей мере одной пары цистеинов.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что сшивающий агент имеет структуру формулы **R-I**.

23. Способ по п. 21, отличающийся тем, что сшивающий агент представляет собой соединение из Таблицы 1, 2 или 3.

24. Способ по любому из пп. 21-22, отличающийся тем, что сшивка имеет структуру $-CH_2-S-L^{s2}-S-CH_2-$, причем каждый конец сшивки независимо связан с альфа-углеродом аминокислотного остатка.

25. Способ, включающий стадии:

введения в контакт коллекции пептидов с мишенью, представляющей интерес, таким образом, чтобы один или несколько сшитых пептидов коллекции связывался с мишенью; и

определения аминокислотных последовательностей сшитых пептидов, которые связываются с мишенью.

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что коллекция представляет собой любую коллекцию по пп. 2-12.

27. Способ по п. 25, отличающийся тем, что коллекцию создают путем замены каждого из одного или нескольких аминокислотных остатков в исходной последовательности независимо на другой аминокислотный остаток.

28. Способ по п. 27, включающий замену по меньшей мере двух аминокислотных остатков, каждого независимо, на аминокислотный остаток, пригодный для сшивания, и сшивание замещающих аминокислотных остатков, пригодных для сшивания.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что каждый из замещающих аминокислотных

остатков, пригодных для сшивания, независимо содержит олефин.

30. Способ по п. 28, отличающийся тем, что замещающие аминокислотные остатки, пригодные для сшивания, представляют собой цистеин.

31. Способ по любому из пп. 27-30, отличающийся тем, что исходная последовательность представляет собой последовательность панкреатического полипептида, нейропептида Y или пептида YY, или ее фрагмент.

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что исходная последовательность принадлежит пептиду YY или его фрагменту.

33. Способ по п. 31, отличающийся тем, что исходную последовательность выбирают из Таблицы S-1.

34. Способ по любому из пп. 25-33, отличающийся тем, что определение аминокислотных последовательностей сшитых пептидов включает определение нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминокислотные последовательности сшитых пептидов.

35. Способ по любому из пп. 25-34, отличающийся тем, что определение аминокислотных последовательностей сшитых пептидов включает определение нуклеотидных последовательностей, содержащихся в фаговых частицах.

36. Способ по любому из пп. 26-35, отличающийся тем, что стадия определения нуклеотидных последовательностей осуществляется путем высокопроизводительного секвенирования.

37. Способ по любому из пп. 26-36, включающий добавление последовательности контрольного зонда перед секвенированием.

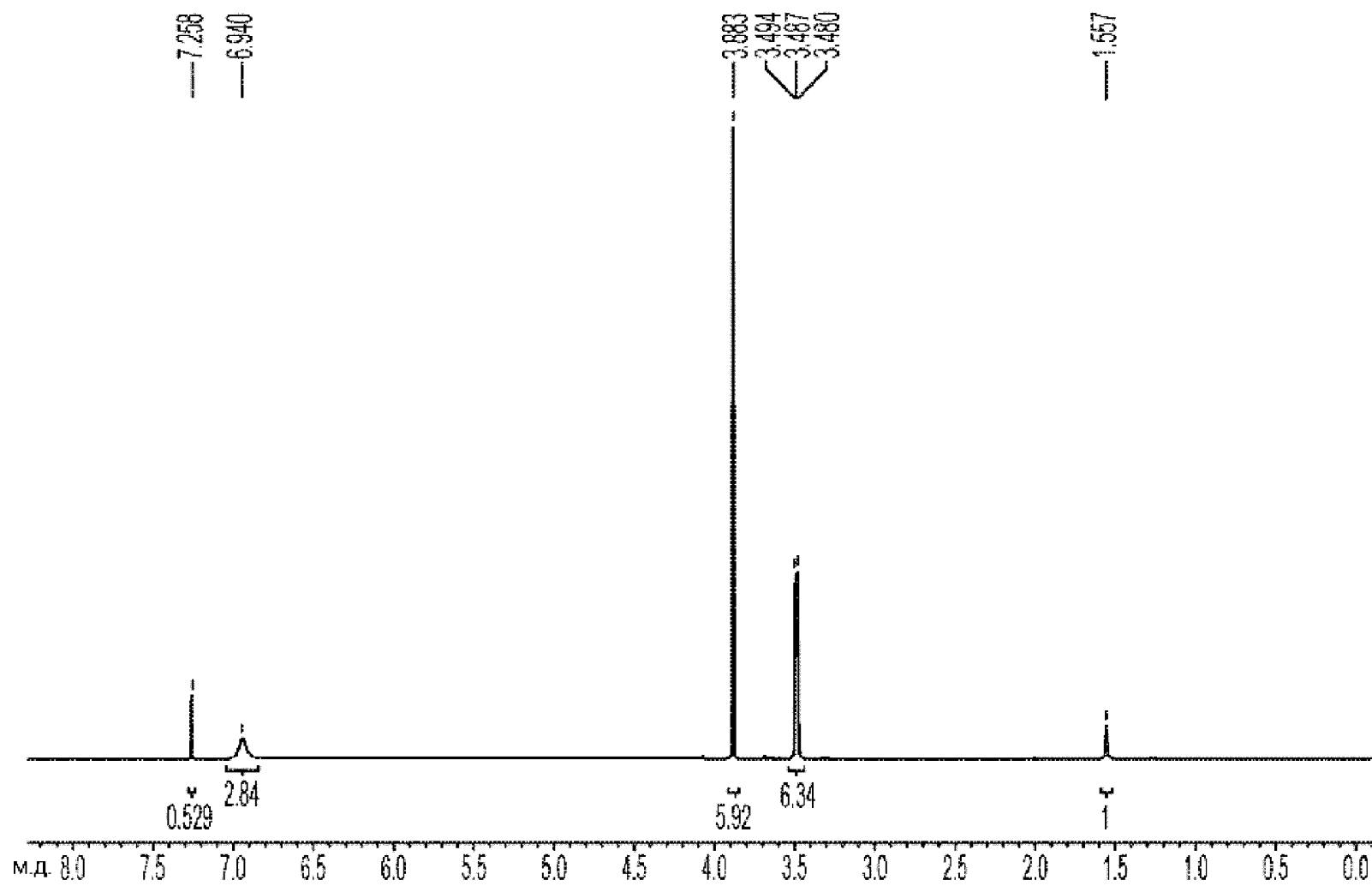
38. Способ по п. 37, отличающийся тем, что с помощью добавляемой контрольной последовательности можно нормировать относительное содержание последовательностей нуклеиновых кислот в образцах.

39. Способ по любому из пп. 24-38, дополнительно включающий синтез второй коллекции сшитых пептидов, каждый из которых имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере общий мотив с одним или несколькими сшитыми пептидами, которые связываются с мишенью.

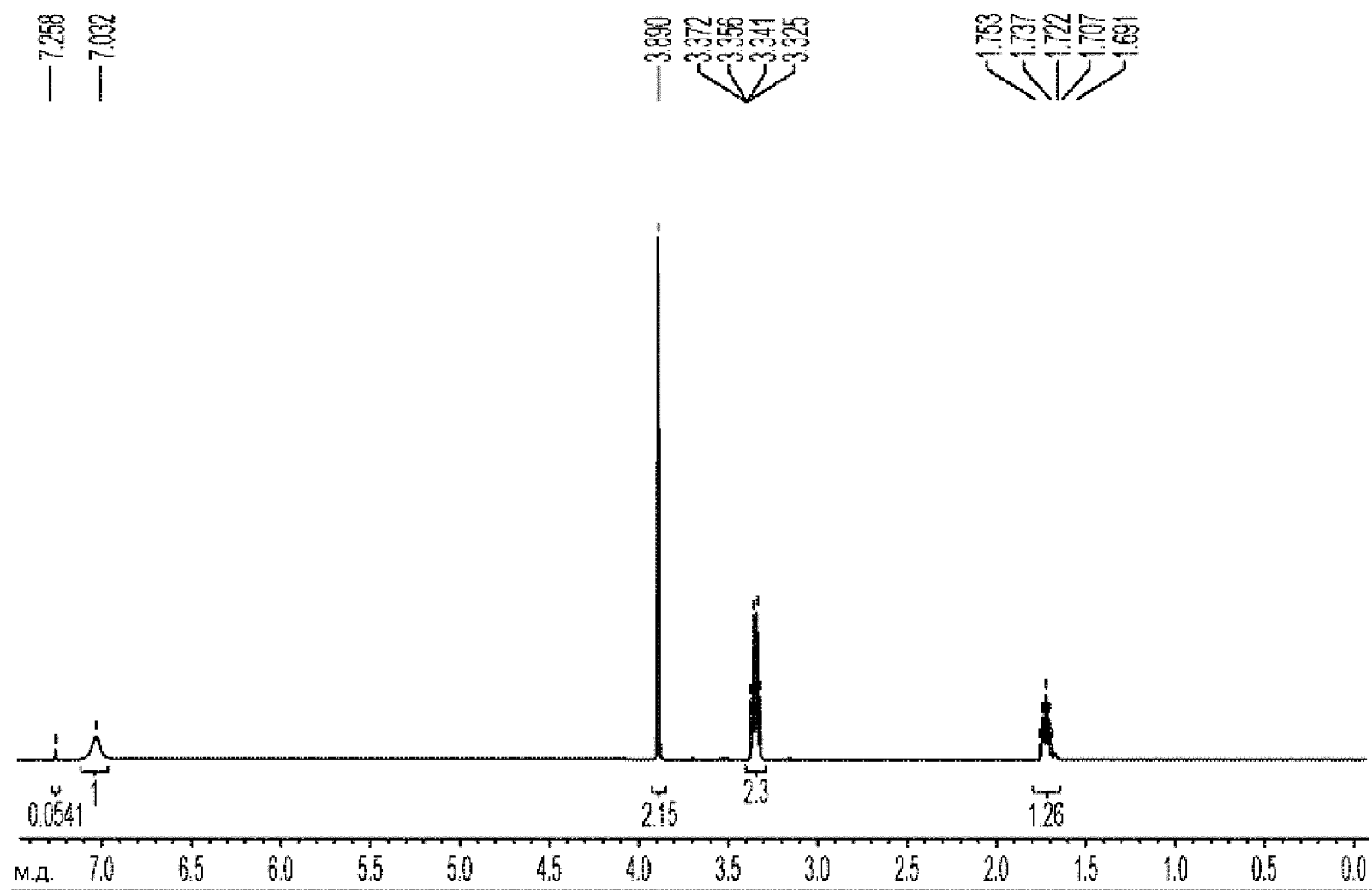
40. Способ, включающий:

модификацию исходного пептида путем замены каждого из одного или нескольких аминокислотных остатков независимо на другой аминокислотный остаток для получения модифицированного пептида, причем модифицированный пептид содержит по меньшей мере два остатка, пригодных для сшивания; и
сшивание двух остатков, пригодных для сшивания.

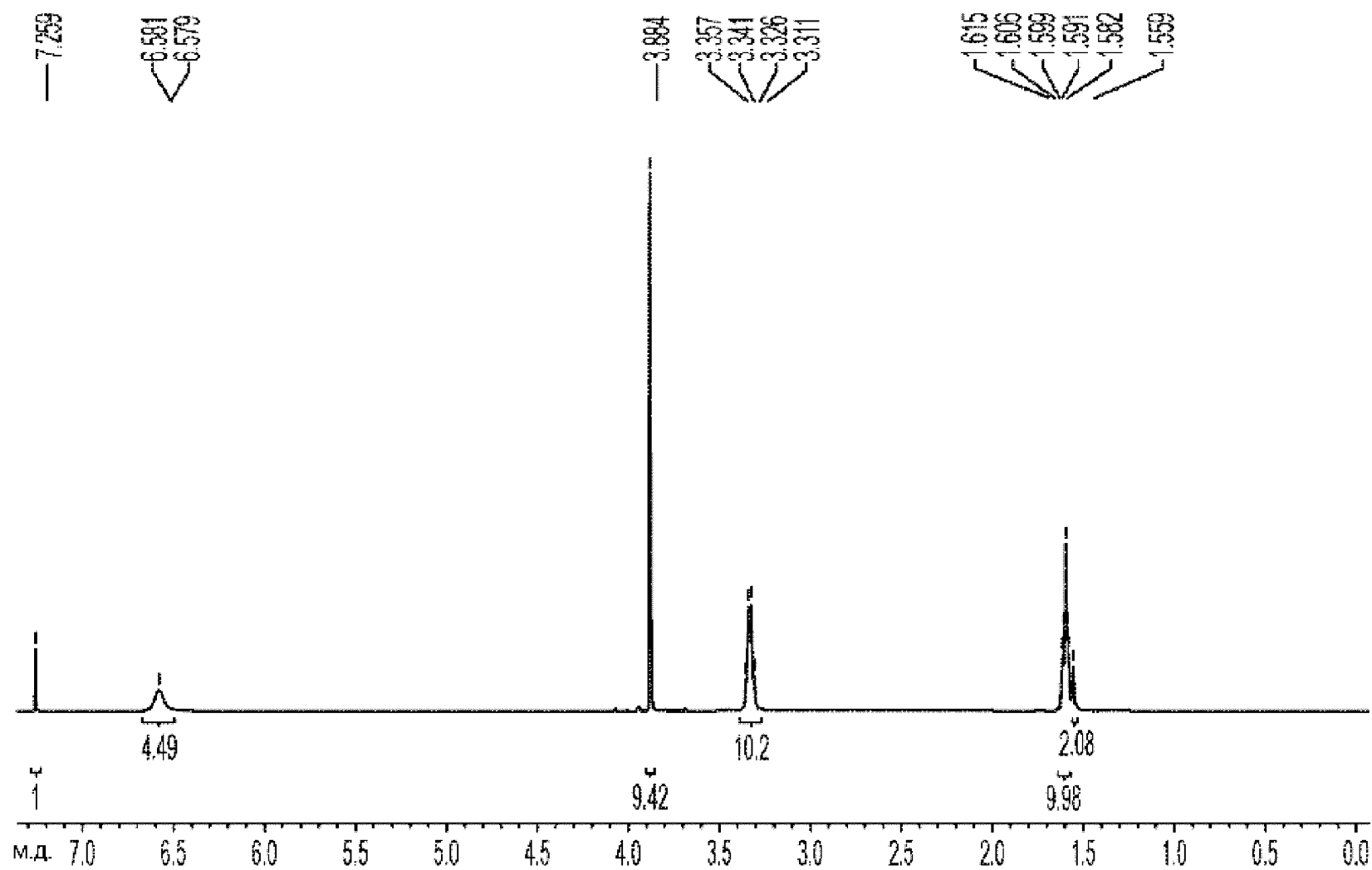
41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что по меньшей мере два остатка, пригодные для сшивания, представляют собой остатки цистеина.
42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что два остатка цистеина являются сшитыми.
43. Способ по любому из пп. 40-42, включающий получение коллекции пептидов, при этом указанная коллекция содержит один или несколько независимо модифицированных пептидов.
44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что коллекция представляет собой коллекцию по любому из пп. 2-12.
45. Способ по п. 43 или 44, отличающийся тем, что коллекция предусматривается в виде библиотеки фагового дисплея.
46. Способ по любому из пп. 43-45, отличающийся тем, что коллекцию получают путем рандомизации одного или нескольких остатков.
47. Способ по любому из пп. 40-46, отличающийся тем, что исходный пептид представляет собой или содержит исходную последовательность, причем исходная последовательность принадлежит панкреатическому полипептиду, нейропептиду Y или пептиду YY, или его фрагменту.
48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что исходная последовательность представляет собой пептид YY или его фрагмент.
49. Способ по п. 47, отличающийся тем, что исходную последовательность выбирают из Таблицы S-1.
50. Способ по любому из пп. 40-49, дополнительно включающий [введение в контакт] модифицированного пептида с представляющей интерес мишенью, так чтобы один или несколько сшитых пептидов из коллекции связывались с мишенью, и определение аминокислотных последовательностей сшитых пептидов, которые связываются с мишенью.
51. Способ по любому из пп. 25-39, отличающийся тем, что коллекция представляет собой коллекцию по любому из пп. 43-49.



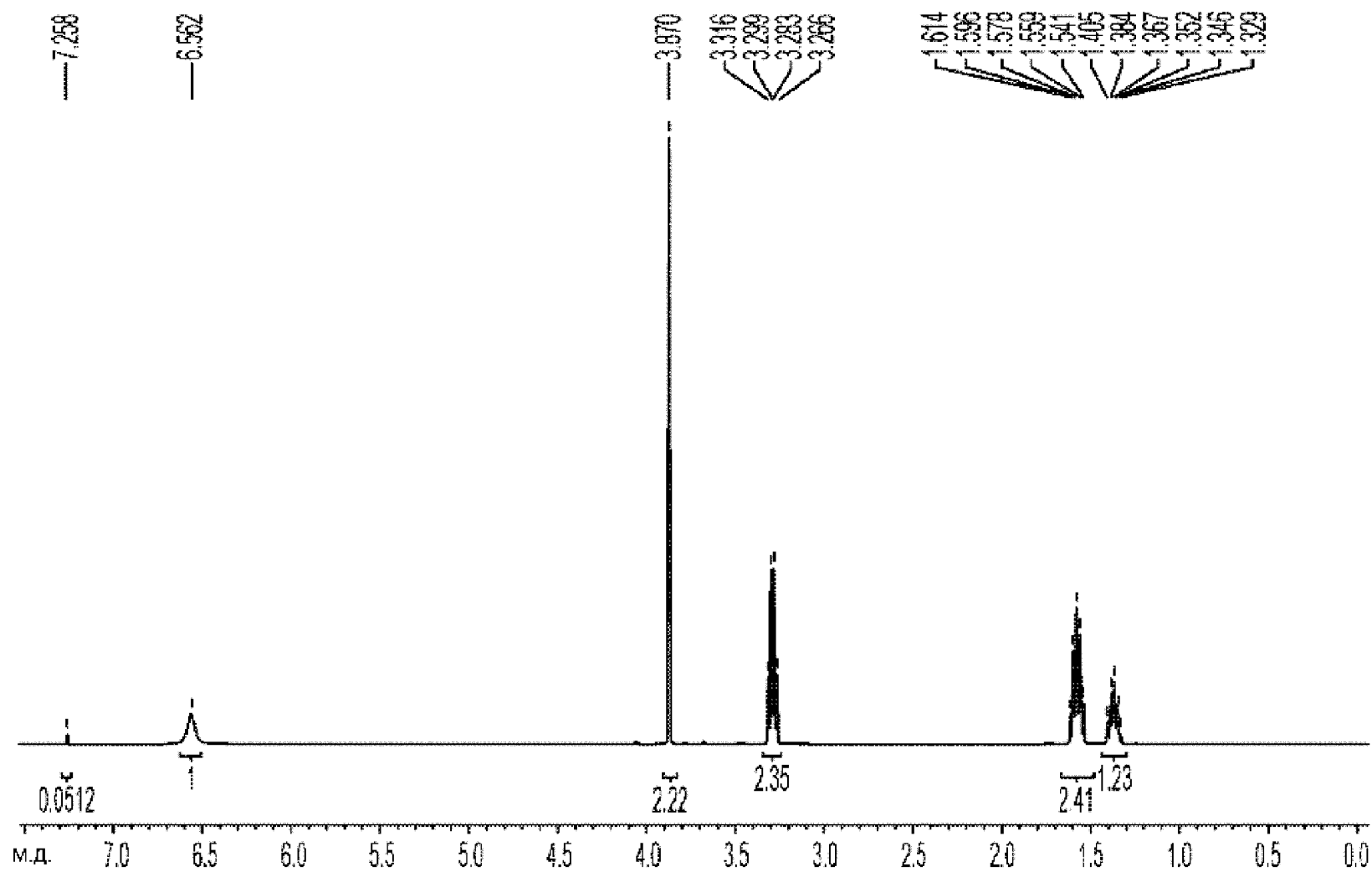
Фиг. 1



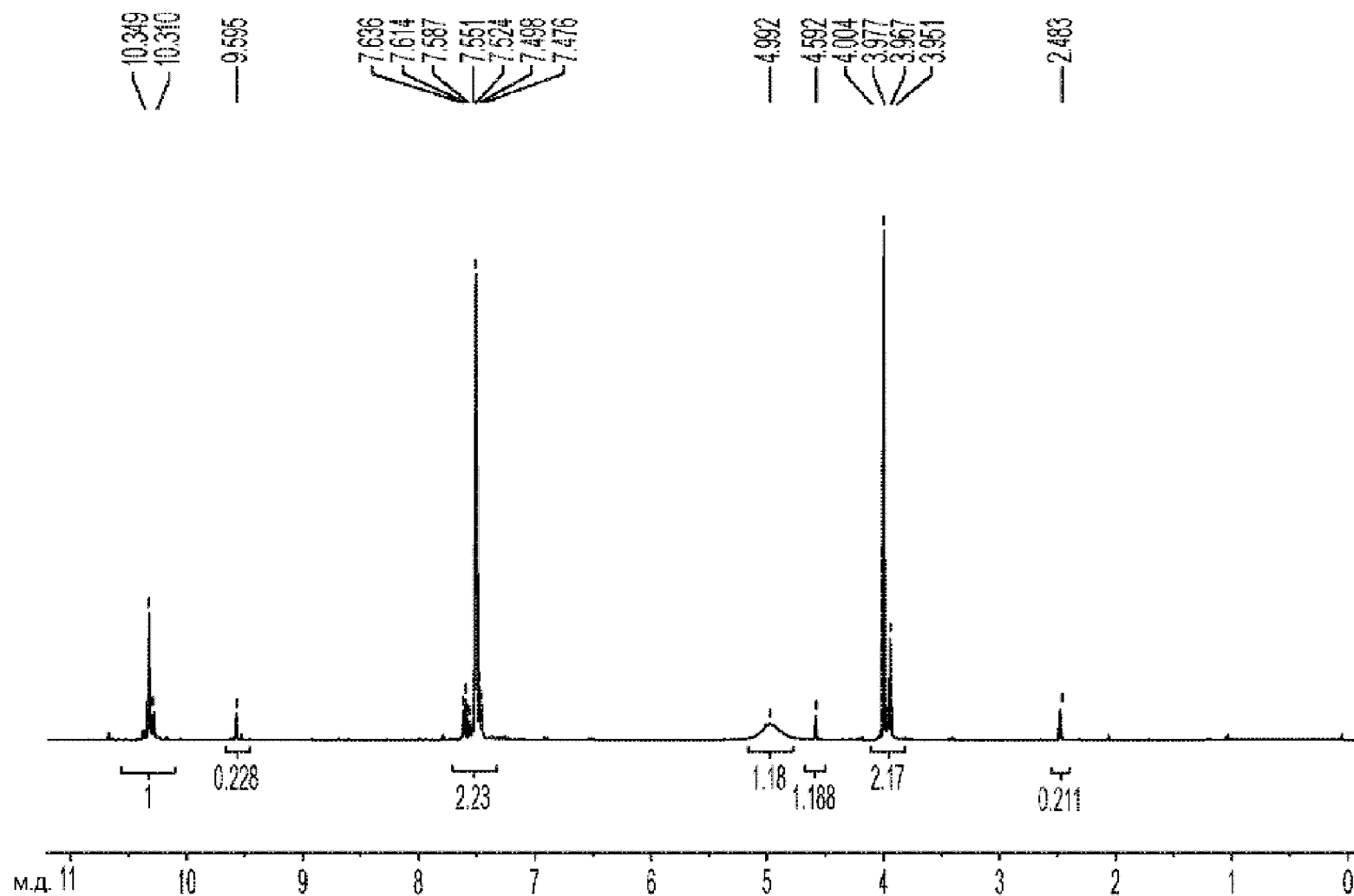
Фиг. 2



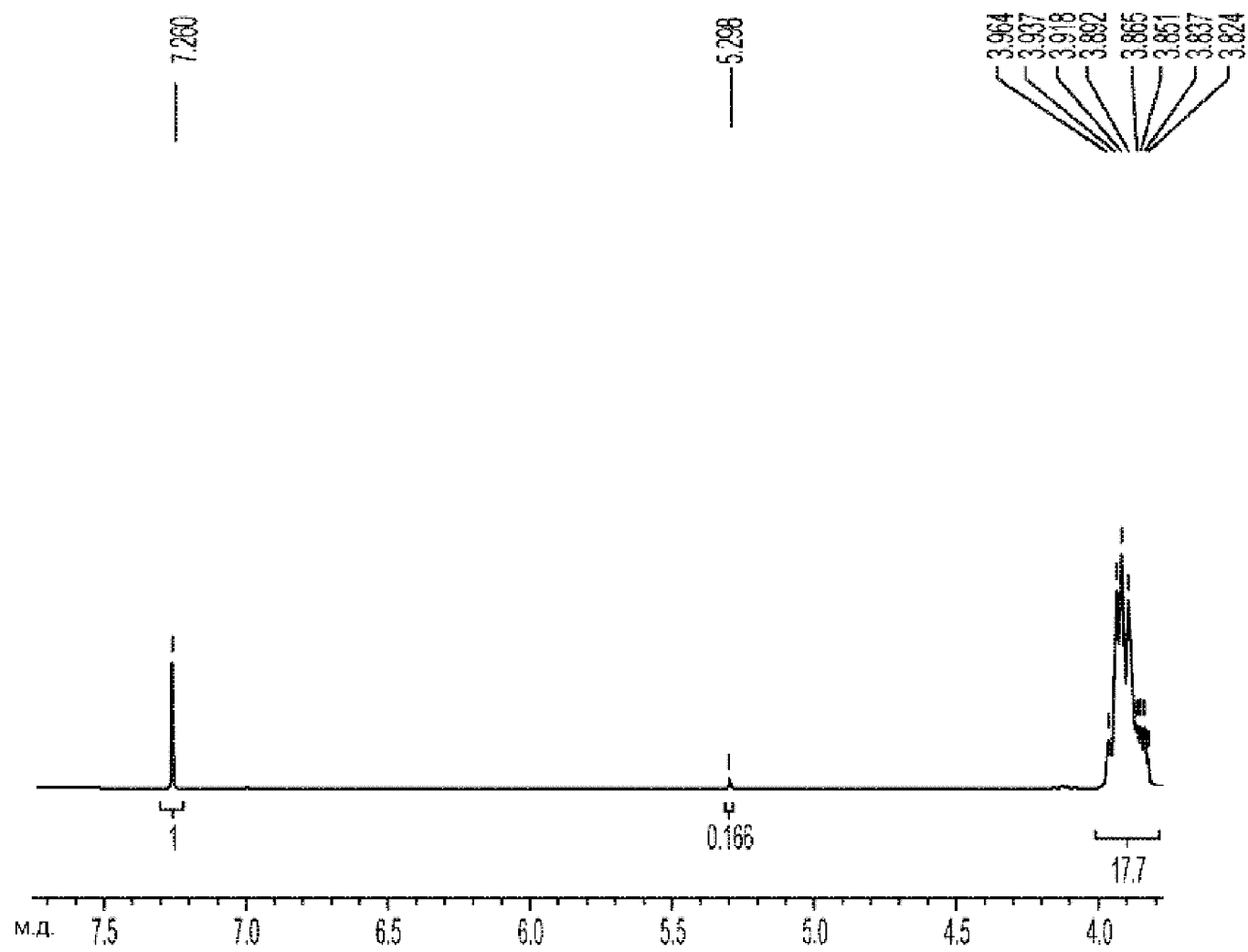
Фиг. 3



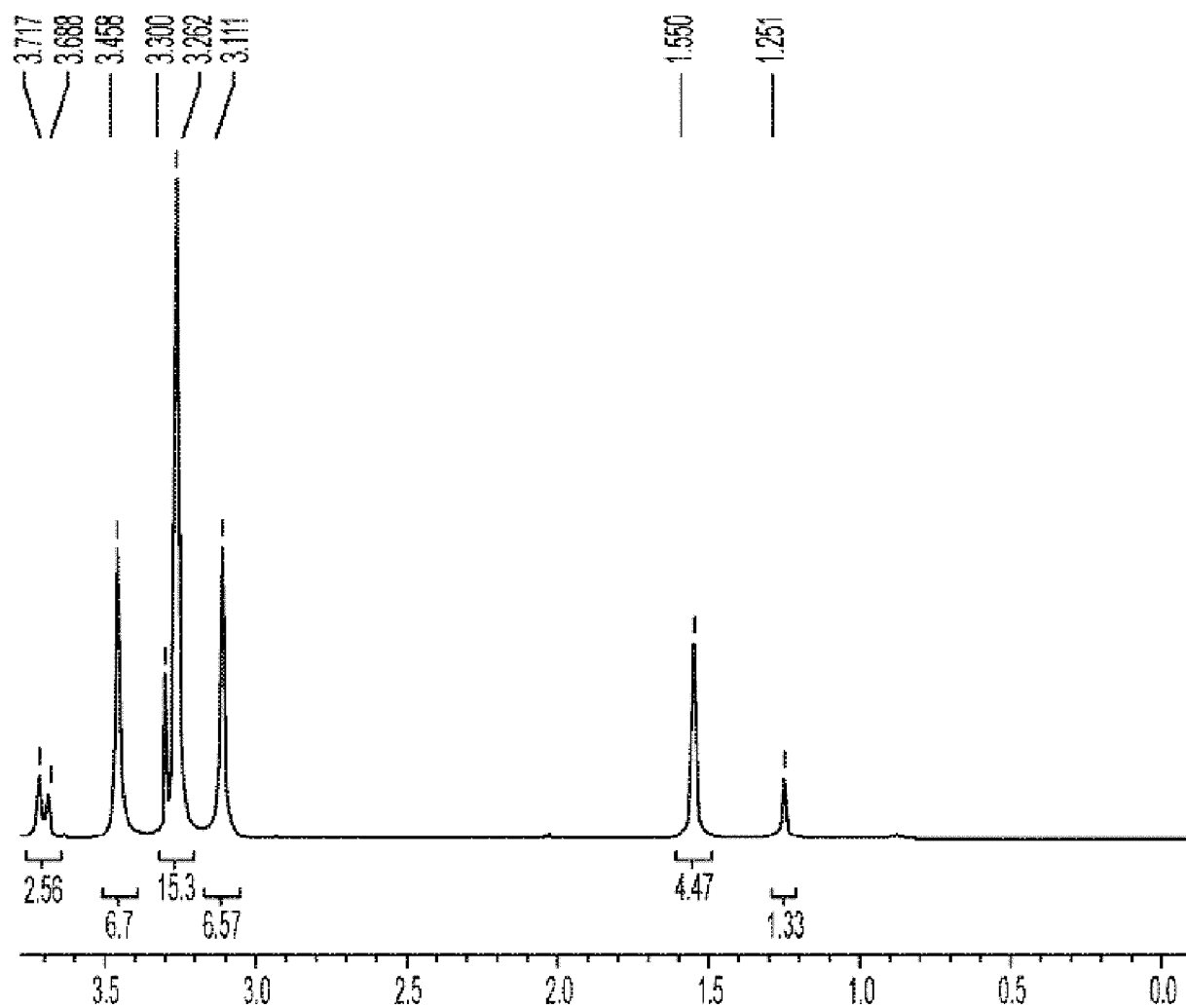
Фиг. 4



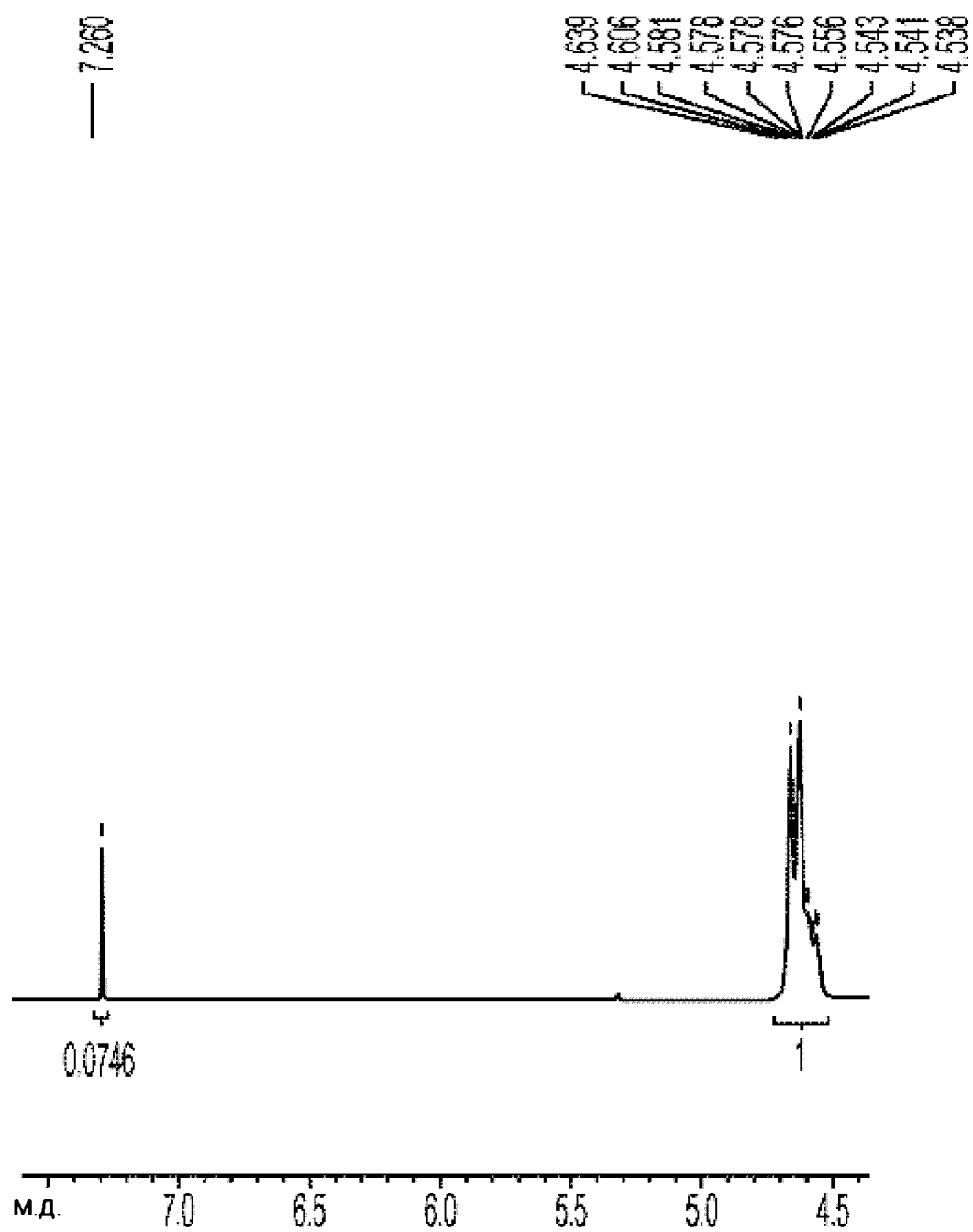
Фиг. 5



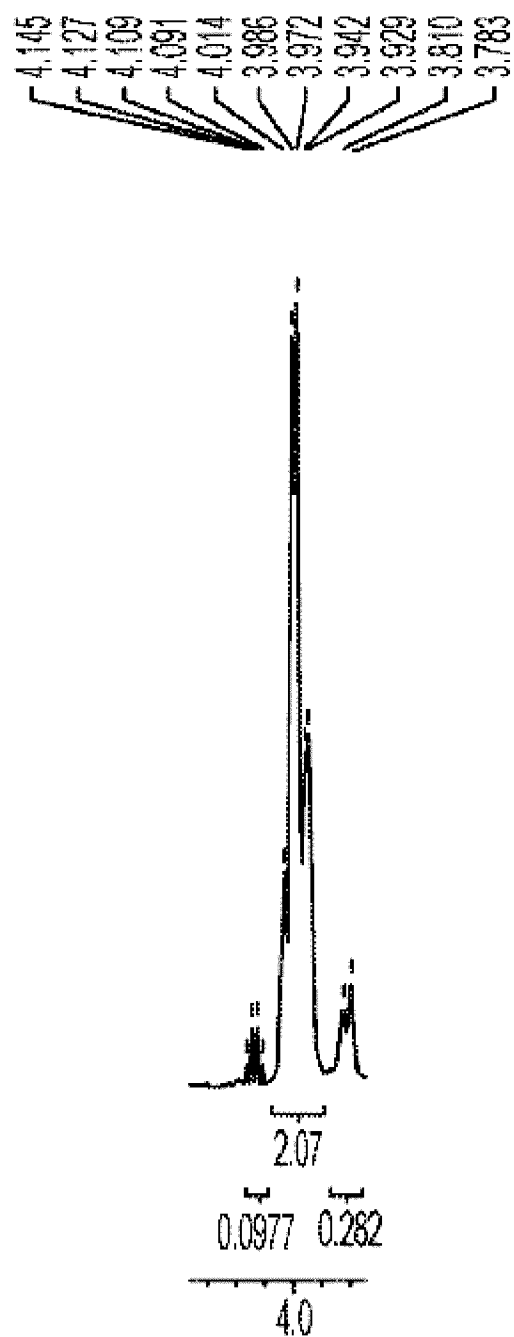
Фиг. 6



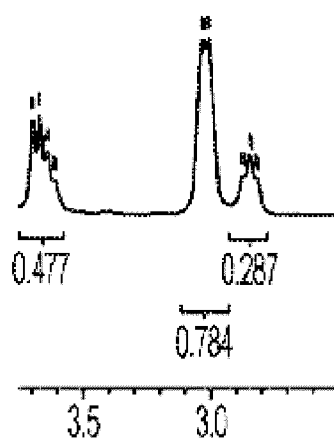
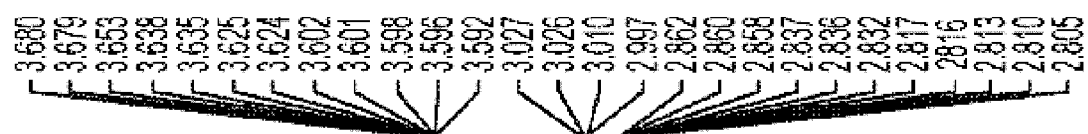
Фиг. 6 (продолж.)



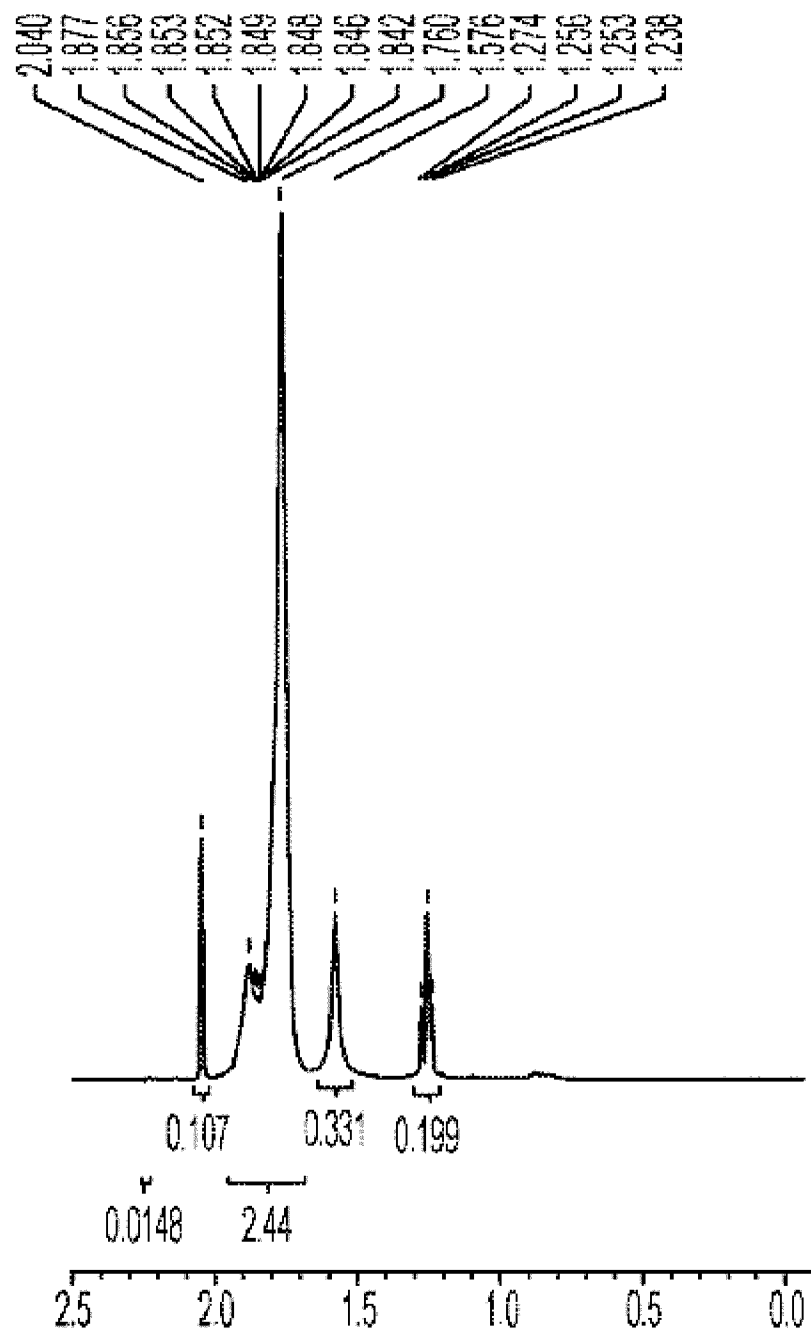
Фиг. 7



Фиг. 7 (продолж.)



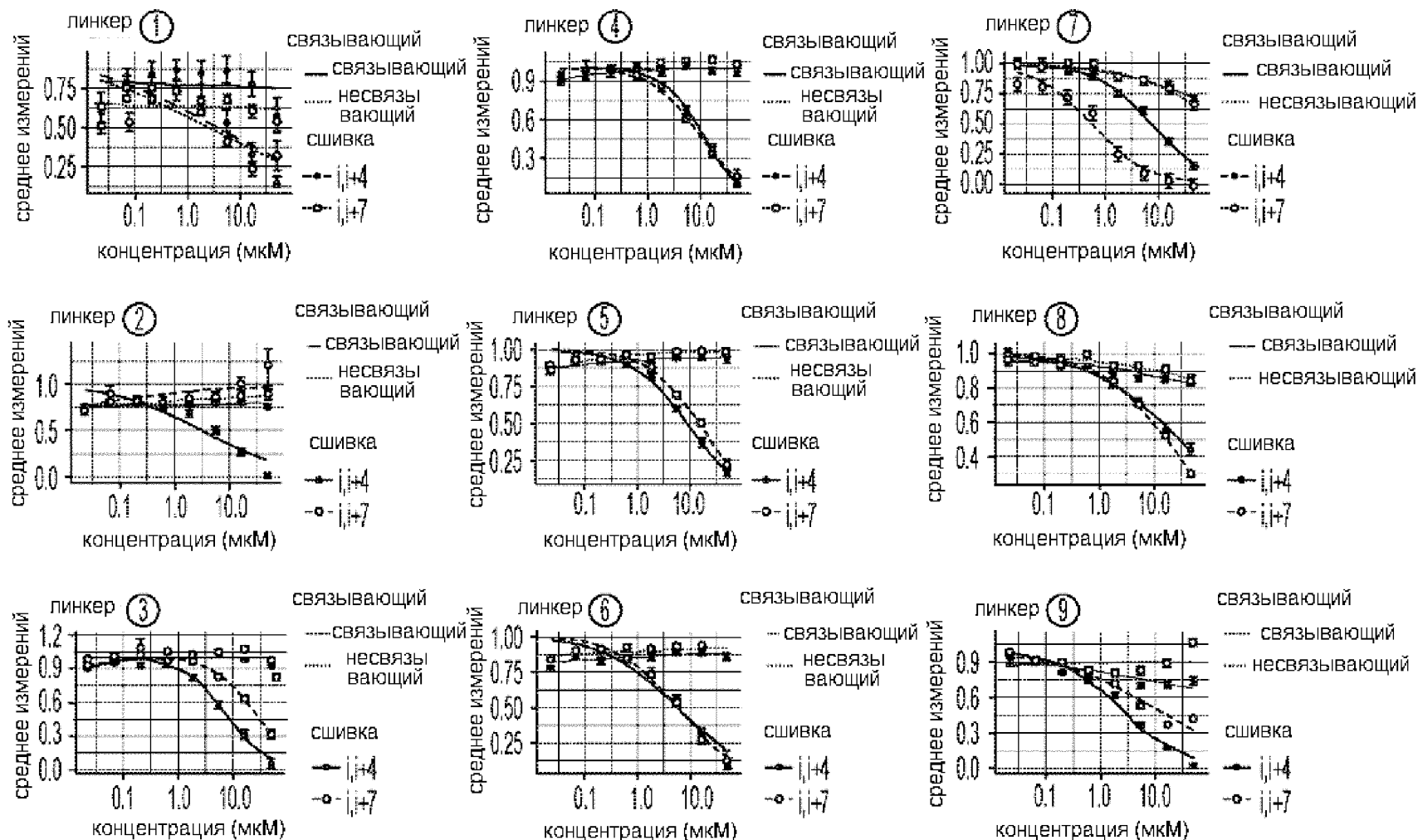
Фиг. 7 (продолж.)



Фиг. 7 (продолж.)



Фиг. 8



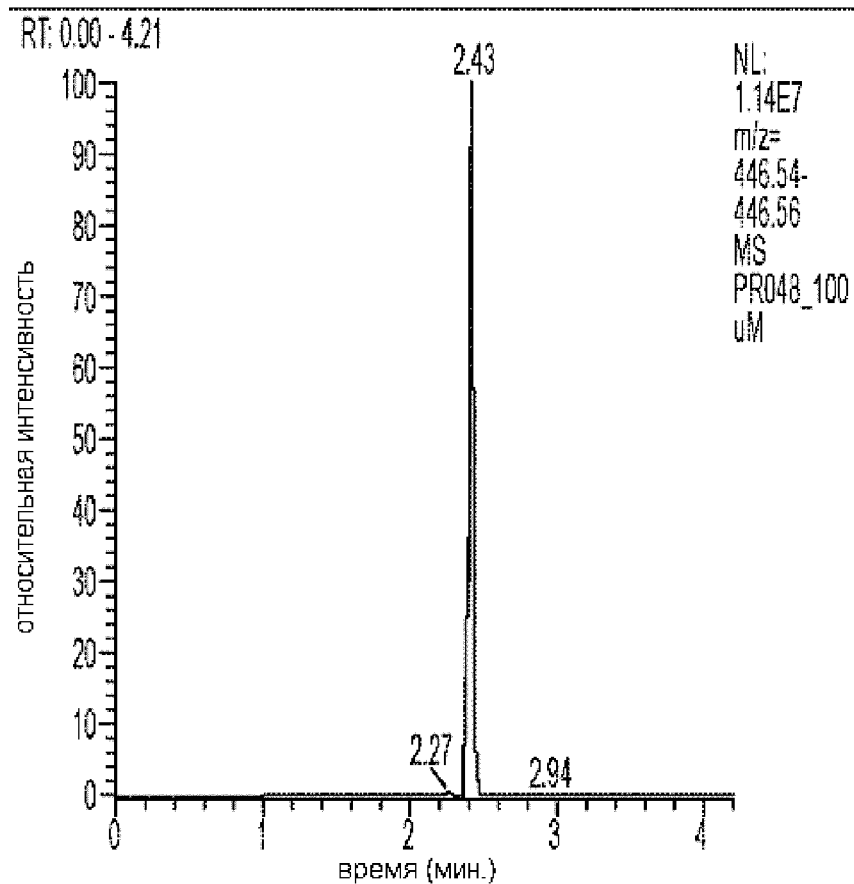
Фиг. 9

идентификатор линкера	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
i,i+7 связывающий	2.9	>50	25.4	8.7	14.6	5.3	0.6	16.3	10.5
i,i+7 несвязывающий	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
i,i+4 связывающий	>50	3.1	7.1	10.1	8.6	5.6	7.8	28.7	2.4
i,i+4 несвязывающий	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50

Фиг. 10

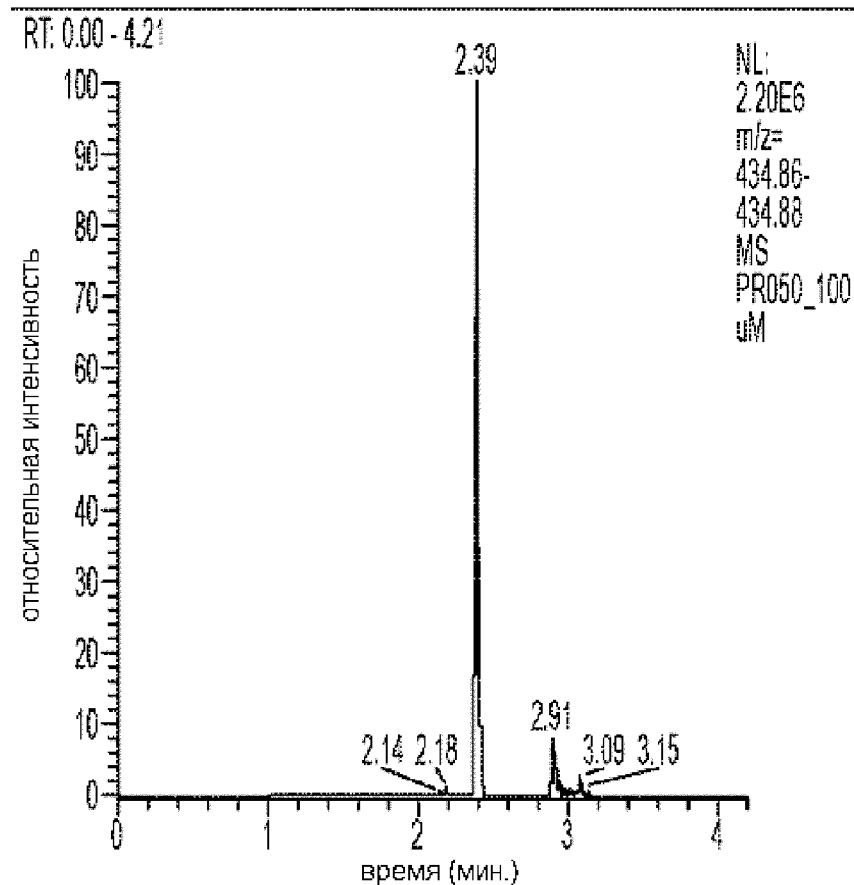
панель А: сшивка i+4

кривая ЖХ



панель В: сшивка i+7

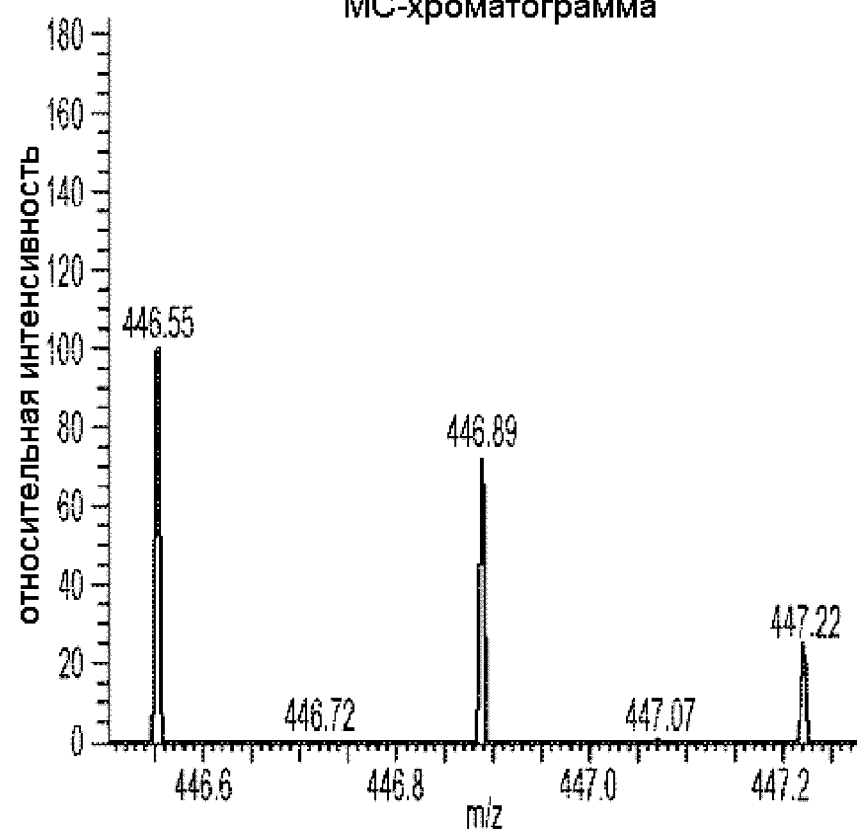
кривая ЖХ



Фиг. 11

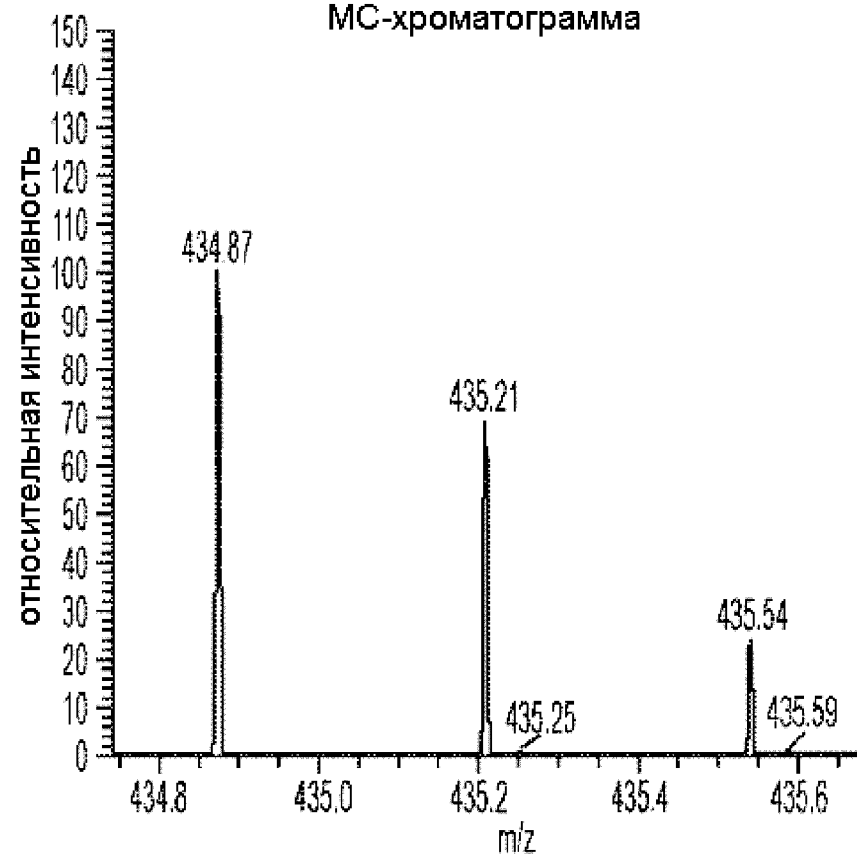
панель А: сшивка i+4

МС-хроматограмма

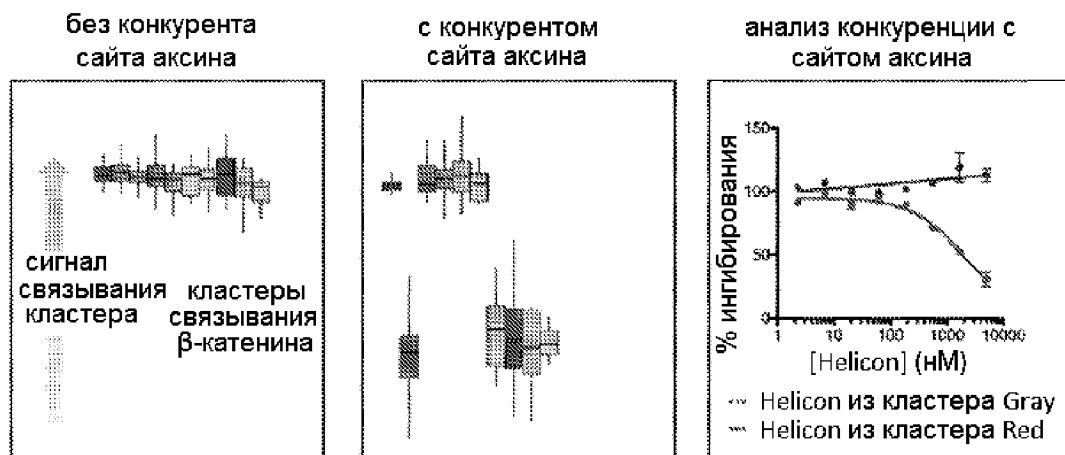


панель В: сшивка i+7

МС-хроматограмма



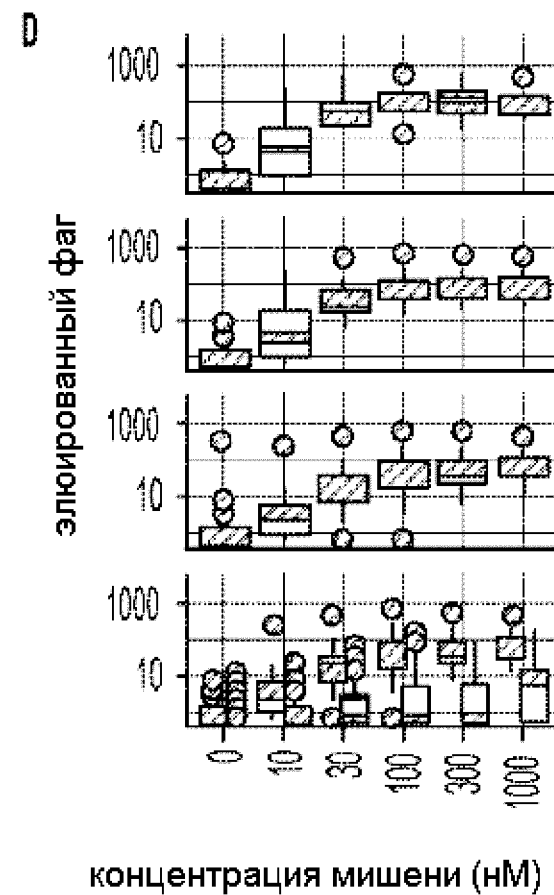
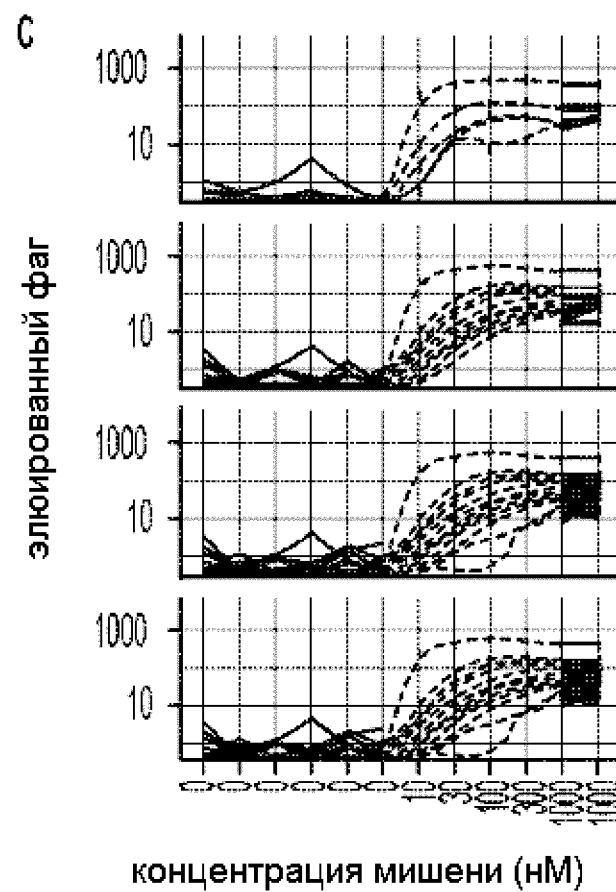
Фиг. 11 (продолж.)



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 13 (продолж.)

E

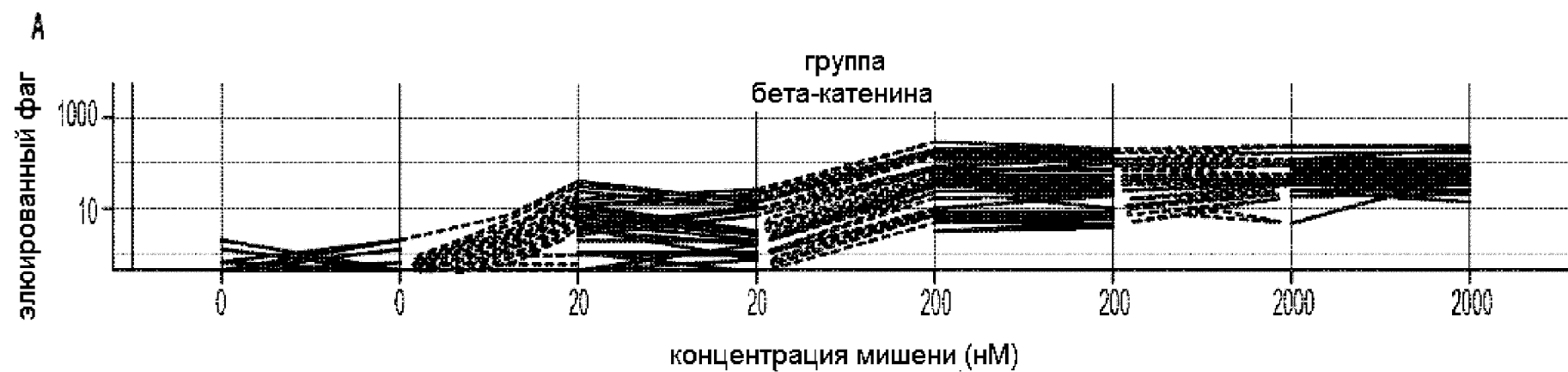
полная последовательность	IC50	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
DPAADDCILAAHLCYIWGGS	15	A	D	D	C	I	L	A	A	H	L	C
DPADEDCLAAHICFMEGGS	26	D	E	D	C	M	L	A	A	H	I	C
DPAHDYCILAAHVCRWDGGS	29	H	D	Y	C	I	L	A	A	H	V	C
DPAYEECILAAHICQTWGGS	29	Y	E	E	C	I	L	A	A	H	I	C
DPATDECFLAAHLCWWEGGS	36	T	D	E	C	F	L	A	A	H	L	C
DPADASCILAAHECDWDGGS	42	D	A	S	C	I	L	A	A	H	E	C
DPAQADCILAAHMCRIGGS	43	Q	A	D	C	I	L	A	A	H	M	C
DPALADCILAAHMCQLWGGS	49	L	A	D	C	I	L	A	A	H	M	C
DPASQDCILAAHWORIDGGS	50	S	Q	D	C	I	L	A	A	H	W	C
DPAESDCILAAYLCSWEGGS	51	E	S	D	C	I	L	A	A	Y	L	C
DPAEAMCDLAAHICNWDGGS	53	E	A	M	C	D	L	A	A	H	I	C
DPAMDECILAAHMCRIHIGGS	60	M	D	E	C	I	L	A	A	H	M	C
DPASDECILAAHMCSVRGGS	69	S	D	E	C	I	L	A	A	H	M	C
DPAEAQCTLAHVCRLEGGS	77	E	A	Q	C	T	L	A	A	H	V	C
DPAEAECQMAAHICALWGGS	90	E	A	E	C	Q	M	A	A	H	I	C

Фиг. 13 (продолж.)

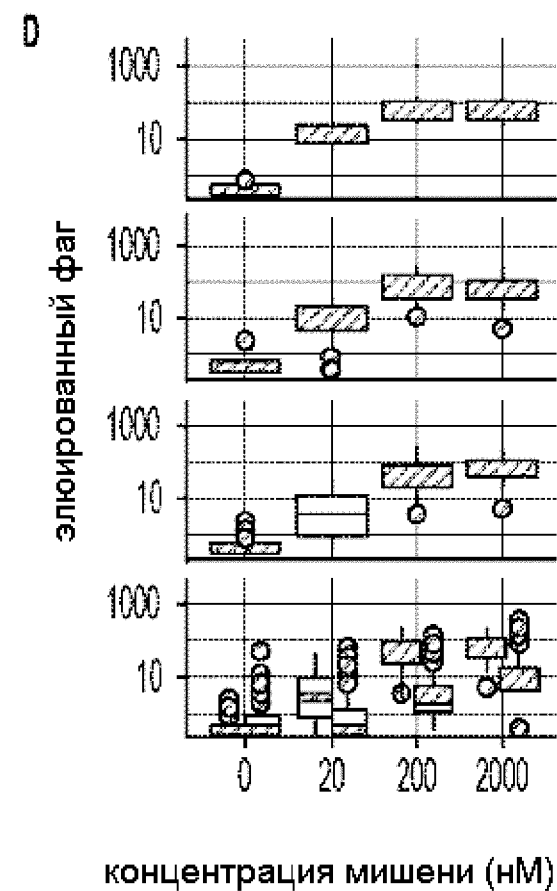
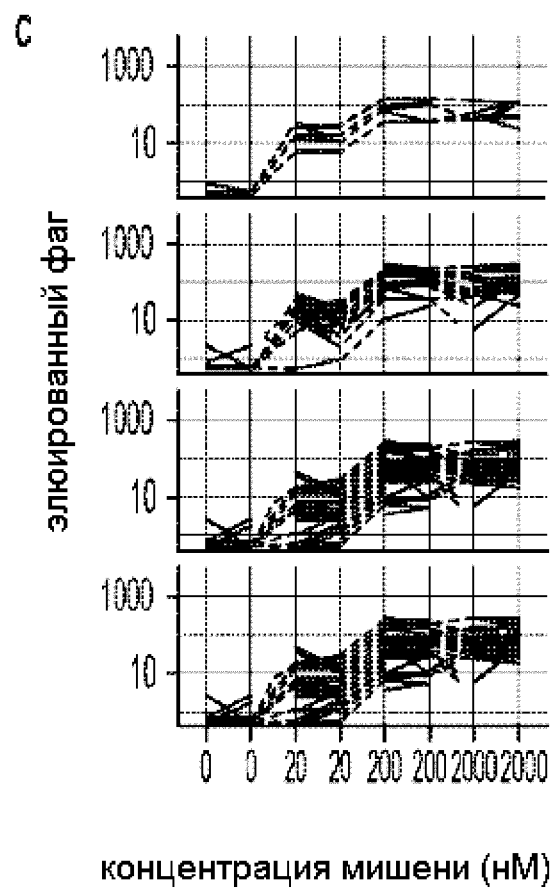
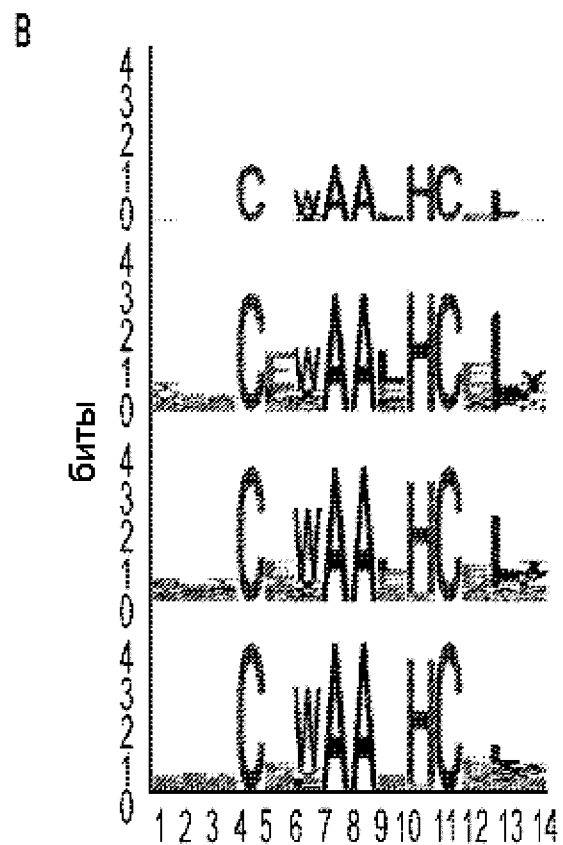
E

X12	X13	X14	..	0	0 (2)	0 (3)	0 (4)	0 (5)	0 (6)	10	30	100	300	1000	1000 (2)
Y	I	W		1	4	1	1	1	0	203	416	561	493	423	412
F	M	E		1	0	0	0	0	0	1	24	8	14	39	45
R	W	D		1	0	0	0	0	0	1	30	58	50	26	56
Q	T	W		0	1	1	0	0	0	11	76	122	148	96	97
W	W	E		0	0	0	0	0	0	2	24	59	59	31	59
D	W	D		2	0	0	0	0	0	7	41	94	110	74	93
R	I	I		4	0	0	0	0	1	9	53	185	184	148	145
Q	L	W		1	1	0	0	0	0	1	23	59	65	100	56
R	I	D		1	0	0	0	0	0	0	4	18	19	17	19
S	W	E		1	0	0	2	0	0	4	12	50	58	26	45
N	W	D		0	0	0	1	0	0	10	15	48	61	26	67
R	H	I		2	1	0	0	1	1	1	8	34	36	35	59
S	V	R		0	0	1	0	1	0	2	7	26	33	31	52
R	L	E		0	0	0	0	1	0	1	13	27	44	61	37
A	L	W		0	0	0	0	0	0	0	6	19	26	22	56

Фиг. 13 (продолж.)



Фиг. 14



Фиг. 14 (продолж.)

E

соединение 1>

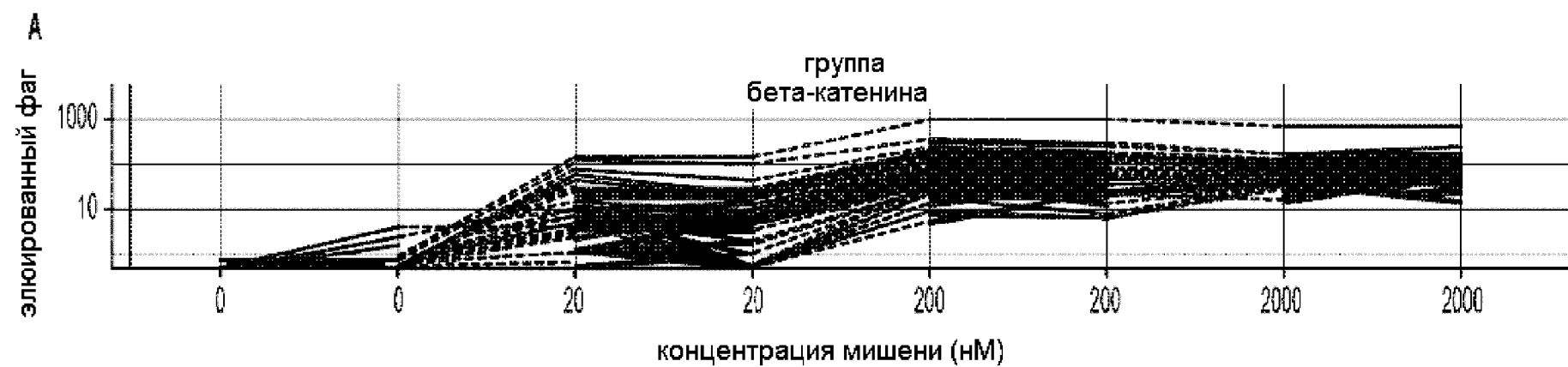
полная последовательность	IC50	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
DPAQDICDWAALHCDLVGGS	45	Q	D	I	C	D	W	A	A	I	H
DPATYFCEWAALHCELNGGS	48	T	Y	F	C	E	W	A	A	L	H
DPATEECFWAAFHCEFLGGS	49	T	E	E	C	F	W	A	A	F	H
DPAWDHCEIAALHCQLNGGS	49	W	D	H	C	E	I	A	A	L	H
DPADADQWAALHCELIGGS	50	D	A	D	C	Q	W	A	A	L	H
DPATHRCEWAALHCELVGGS	50	T	H	R	C	E	W	A	A	L	H
DPAQDFCFWAAEHCELLGGS	54	Q	D	F	C	F	W	A	A	E	H
DPAAEICEFAALHCSLIGGS	54	A	E	I	C	E	F	A	A	L	H
DPADQTCMWAAEHCAVGGGS	58	D	Q	T	C	M	W	A	A	E	H
DPAMATCEVAALHCELIGGS	58	M	A	T	C	E	V	A	A	L	H
DPAYWECEWAAEHCSLTGGS	59	Y	W	E	C	E	W	A	A	E	H
DPAYITCEWAAEHCDLTGGS	60	Y	I	T	C	E	W	A	A	E	H
DPADEYCMWAAFHCDFVGGS	63	D	E	Y	C	M	W	A	A	F	H
DPATRRCEIAALHCELLGGS	93	T	R	R	C	E	I	A	A	L	H
DPADHCEMAALHCAVIGGS	101	D	E	H	C	E	M	A	A	L	H

Фиг. 14 (продолж.)

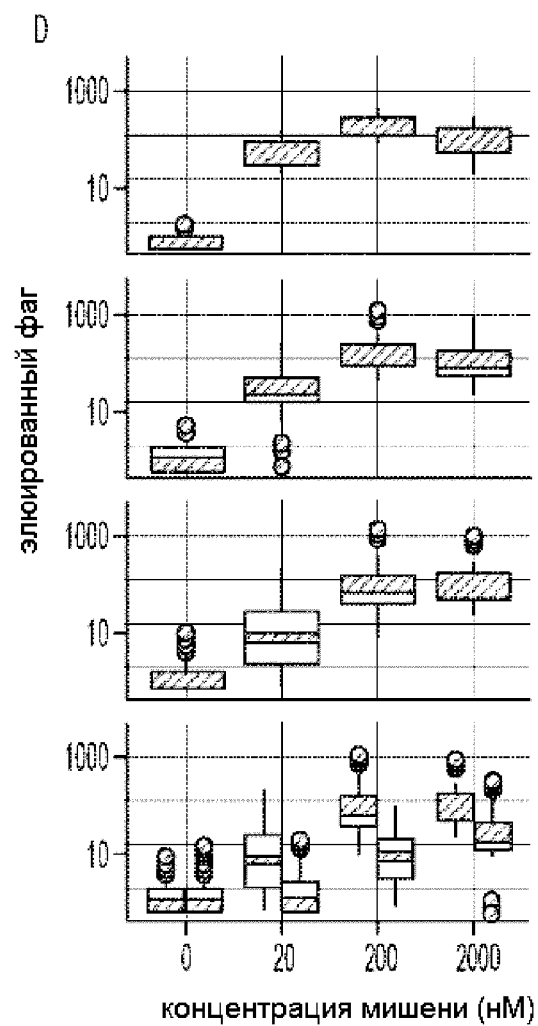
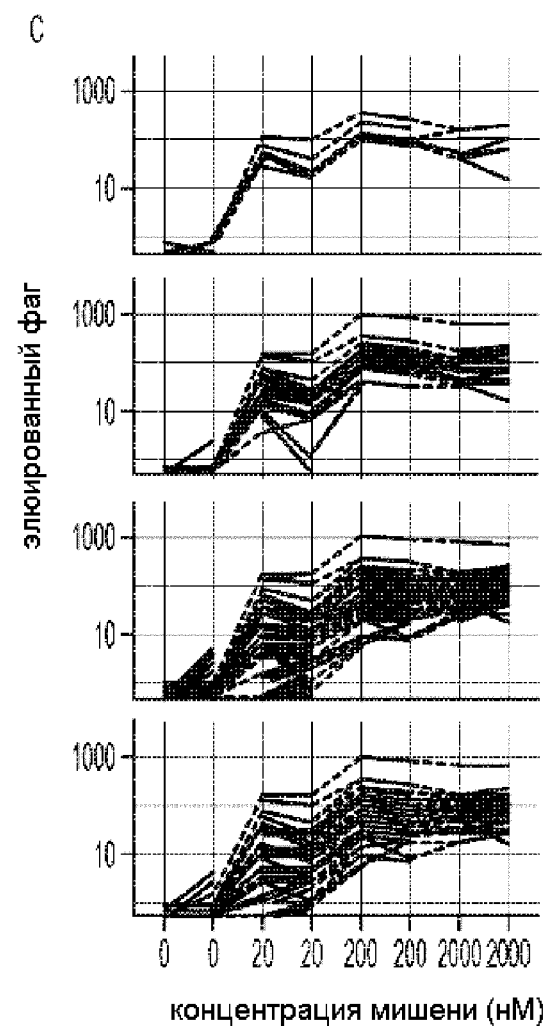
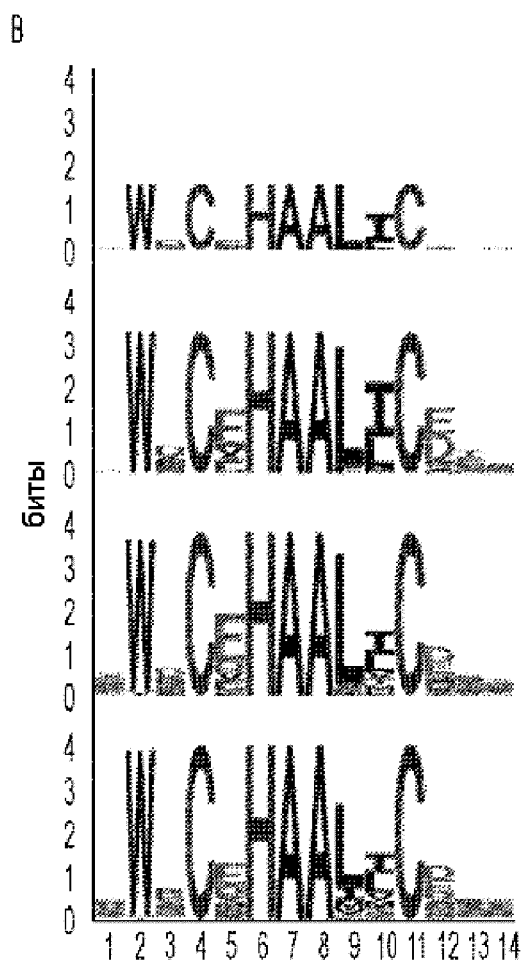
E

X11	X12	X13	X14	..	0	0 (2)	20	20 (2)	200	200 (2)	2000	2000 (2)
C	D	L	V		1	0	13	10	64	34	41	45
C	E	L	N		0	0	16	17	71	98	36	75
C	E	F	L		0	0	31	9	80	97	56	90
C	Q	L	N		0	0	24	25	131	137	118	98
C	E	L	I		0	0	6	6	37	31	41	23
C	E	L	V		0	0	30	13	145	91	36	83
C	E	L	L		1	2	17	27	188	140	62	128
C	S	L	I		2	0	39	18	218	201	159	173
C	A	L	V		0	1	5	8	71	83	56	45
C	E	L	I		0	1	7	4	58	69	21	68
C	S	L	T		0	0	13	13	263	175	97	75
C	D	L	T		1	0	9	2	80	92	46	98
C	D	F	V		0	0	0	1	10	22	5	45
C	E	L	L		1	0	5	9	66	78	103	98
C	A	L	I		2	0	11	4	179	152	231	241

Фиг. 14 (продолж.)



Фиг. 15



Фиг. 15 (продолж.)

E

соединение 2 >

полная последовательность	IC50	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
DPAYWQCDHAALICEIEGGS	33	Y	W	Q	C	D	H	A	A	L	I
DPAFWDCENHAALICQADGGS	36	F	W	D	C	E	H	A	A	L	I
DPALWACEHAALICETQGGS	41	L	W	A	C	E	H	A	A	L	I
DPAAWDCENHAALLCDLQGGS	42	A	W	D	C	E	H	A	A	L	L
DPADWDCVHAALICDLVGGS	50	D	W	D	C	V	H	A	A	L	I
DPADWDCFHAALICDSMGGS	50	D	W	D	C	F	H	A	A	L	I
DPAQWNCEHAALLCETNGGS	50	Q	W	N	C	E	H	A	A	L	L
DPASWSCEHAALICDQWGGGS	51	S	W	S	C	E	H	A	A	L	I
DPADWFCEHAALLCSEIGGS	51	D	W	F	C	E	H	A	A	L	L
DPAYWDCVHAALICETEGGS	53	V	W	D	C	V	H	A	A	L	I
DPARWACEHAALLCDMHGGS	53	R	W	A	C	E	H	A	A	L	L
DPATWECEHAALLCAQDGGGS	55	T	W	E	C	E	H	A	A	L	L
DPAYWDCYHAAFICEEIGGS	58	Y	W	D	C	Y	H	A	A	F	I
DPASWRCLHAALICDSQGGGS	61	S	W	R	C	L	H	A	A	L	I
DPANWMCEHAALMCEEYGGGS	62	N	W	M	C	E	H	A	A	L	M

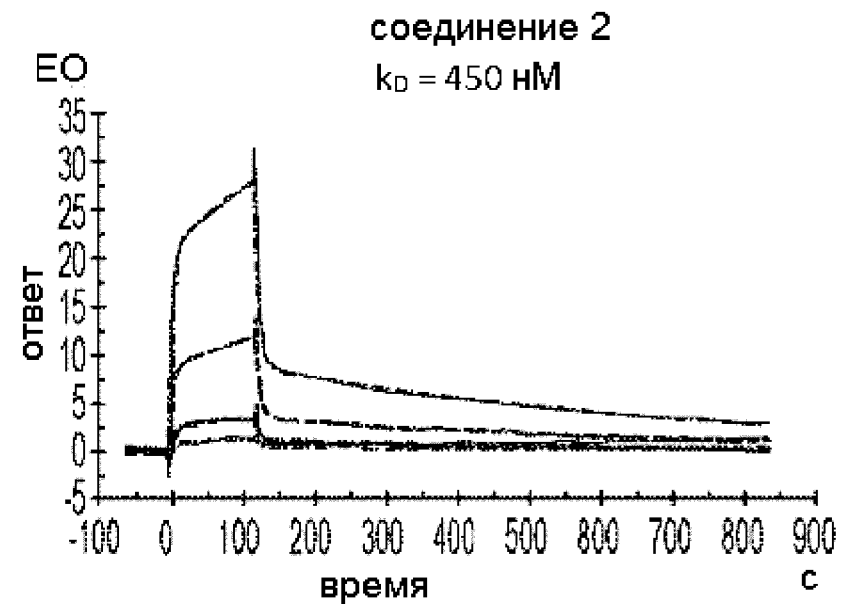
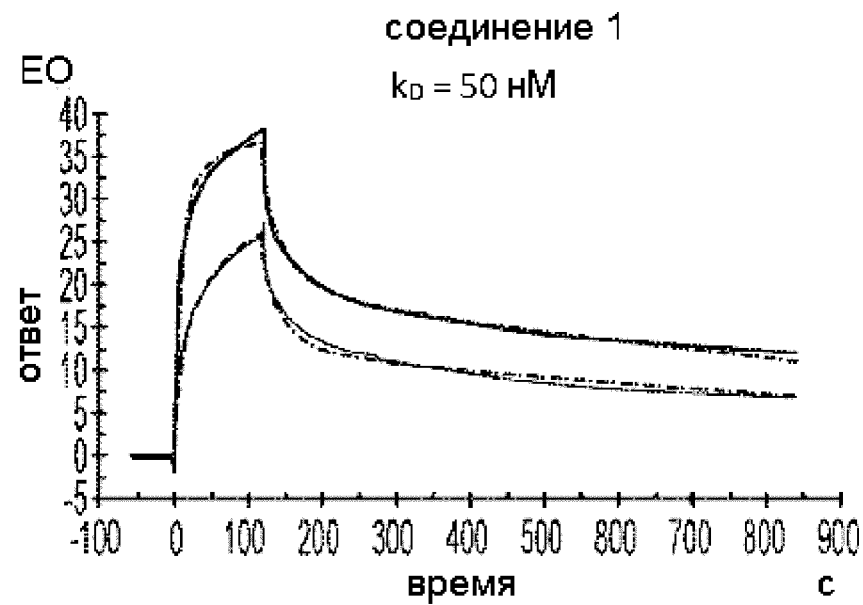
Фиг. 15

E

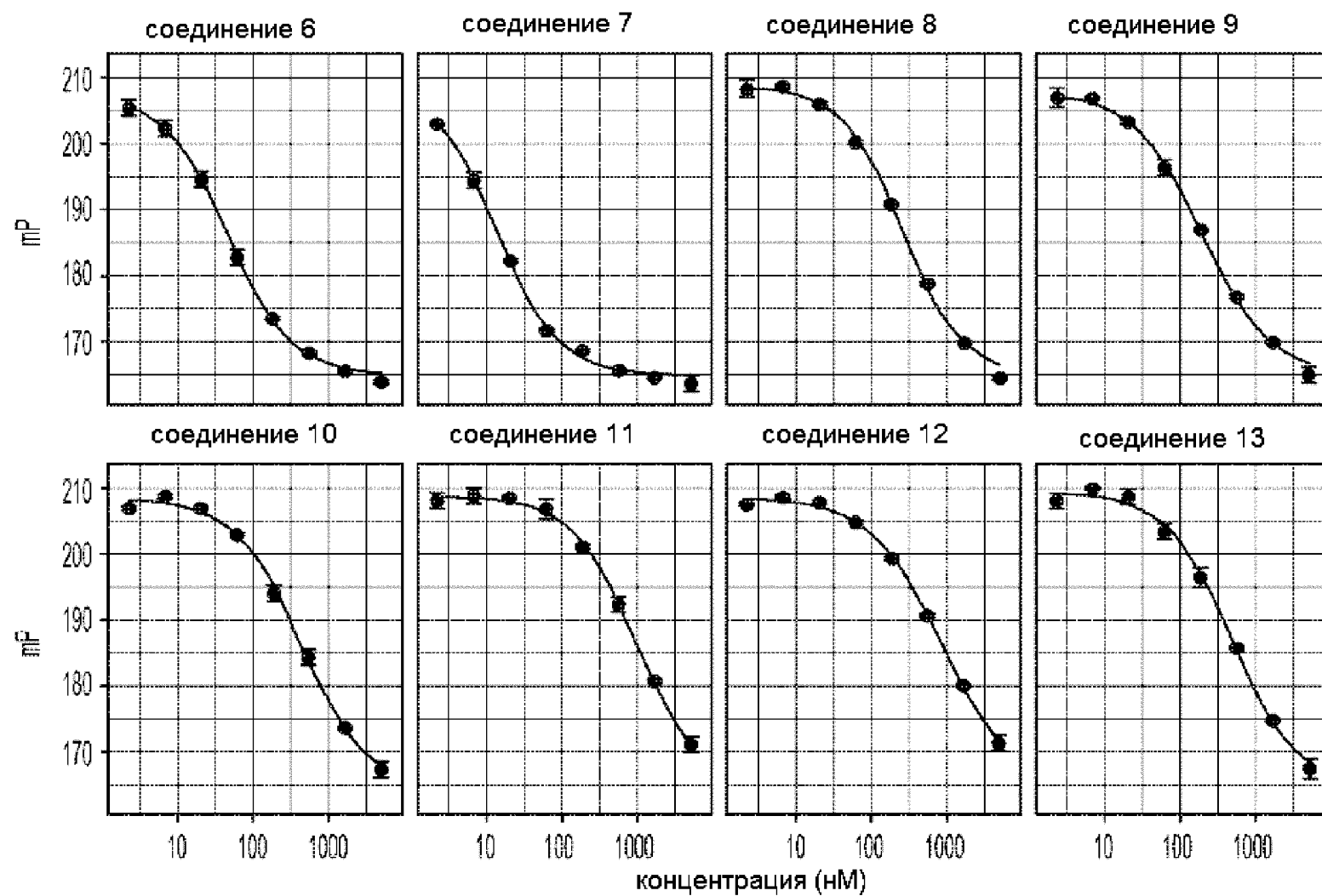
X11	X12	X13	X14	..	0	0 (2)	20	20 (2)	200	200 (2)	2000	2000 (2)
C	E	I	E		0	0	112	98	322	266	156	188
C	Q	A	D		0	1	37	22	92	80	41	15
C	E	T	Q		1	0	69	43	223	169	113	98
C	D	L	Q		0	0	51	20	132	108	46	98
C	D	L	V		0	0	25	17	113	115	46	60
C	D	S	M		0	1	28	27	157	151	72	211
C	E	T	N		0	0	134	149	918	804	631	625
C	D	Q	W		1	1	15	8	77	54	26	98
C	S	E	I		0	1	28	16	98	166	67	105
C	E	T	E		0	0	11	6	61	63	36	38
C	D	M	H		0	0	3	6	37	31	26	38
C	A	Q	D		0	0	21	15	183	145	97	166
C	E	E	I		1	0	26	20	167	103	133	158
C	D	S	Q		0	0	9	0	61	62	41	38
C	E	E	Y		0	2	7	1	84	72	51	83

Фиг. 15 (продолж.)

связывание с бета-катенином
(Biacore)



Фиг. 16



Фиг. 17