

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042923**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.05

(21) Номер заявки
201991102

(22) Дата подачи заявки
2017.11.01

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 5/08 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)

(54) АЛЬФА-V БЕТА-6 ЛИГАНДЫ ИНТЕГРИНА И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/415,752

(32) 2016.11.01

(33) US

(43) 2019.09.30

(86) PCT/US2017/059550

(87) WO 2018/085415 2018.05.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭРРОУХЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛС,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Алмейда Аарон, Ли Чжэнь, Буш
Эрик В, Пэй Тао, Глебоцка Ангешка,
Николас Энтони, Карлсон Джеффри,
Фаулер-Уоттерс Мэттью (US)**

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

(56) US-A1-20160009806

LU H. et al.: "Site-specific Antibody-polymer
Conjugates for siRNA Delivery", Journal of the
American Chemical Society, 05 September 2013, vol.
135, № 37, pages 1-15; abstract; page 5, paragraph 3,
DOI: 10.1021/ja4059525

US-A1-20150125392

US-A1-20020168363

DECHANTSREITER M.A. et al.: "N-
Methylated Cyclic RGD Peptides as Highly Active
and Selective $\alpha V \beta 3$ Integrin Antagonists", Journal of
Medicinal Chemistry, 12 August 1999, vol. 42, №
16, pages 3033-3040; abstract; page 3038, column 2,
paragraph 4

(57) Описаны лиганды интегрин, имеющие стабильность в сыворотке и аффинность к интегринам $\alpha v \beta 6$. Также описаны композиции, содержащие лиганды интегрин $\alpha v \beta 6$, имеющие стабильность в сыворотке и имеющие аффинность к интегринам $\alpha v \beta 6$, и способы их применения.

B1**042923****042923****B1**

Ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/415752, поданной 1 ноября 2016 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Раскрыты пептидные лиганды интегрина альфа- ν бета-6 ($\alpha\nu\beta 6$), способные целенаправленно воздействовать на интегрин $\alpha\nu\beta 6$ и/или целенаправленно воздействовать на клетки, которые экспрессируют интегрин $\alpha\nu\beta 6$. Лиганды интегрина $\alpha\nu\beta 6$ могут быть конъюгированы с одной или более карго-молекулами для облегчения доставки карго-молекул в экспрессирующие интегрин $\alpha\nu\beta 6$ клетки, например эпителиальные клетки.

Уровень техники

Интегрин альфа- ν бета-6 ($\alpha\nu\beta 6$), который экспрессируется в различных эпителиальных клетках, представляет рецептор для латентно-ассоциированного пептида (LAP) TGF- β и для (ECM) белков фибронектина, витронектина и тенасцина.

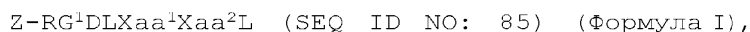
С трудом обнаруживаемый в эпителии нормальных здоровых взрослых людей интегрин $\alpha\nu\beta 6$ имеет повышенный уровень экспрессии во время заживления ран и при разных видах рака (например, при раке толстой кишки, яичников, эндометрия и желудка) и часто связан с плохим прогнозом рака. Было показано, что интегрин $\alpha\nu\beta 6$ может стимулировать инвазию клеток и миграцию при метастазировании и ингибировать апоптоз. Интегрин $\alpha\nu\beta 6$ также может регулировать экспрессию матриксных металлопротеиназ (MMP) и активировать TGF- $\beta 1$. Существует все больше доказательств, в первую очередь, из исследований *in vitro*, которые подтверждают, что интегрин $\alpha\nu\beta 6$ может содействовать развитию рака. Таким образом, интегрин $\alpha\nu\beta 6$ является привлекательным и в качестве биомаркера опухоли и потенциальной терапевтической мишени и из-за его роли в экспрессии матриксных металлопротеиназ (MMP) и активации TGF- $\beta 1$.

Сущность изобретения

В настоящем документе описаны новые, сконструированные, не существующие в природе пептидные лиганды интегрина $\alpha\nu\beta 6$ (также называемые лиганды $\alpha\nu\beta 6$). Раскрытые в настоящем описании лиганды интегрина $\alpha\nu\beta 6$ являются стабильными в сыворотке и обладают аффинностью к интегрину $\alpha\nu\beta 6$ и могут специфически с ними связываться. Кроме того, в настоящем документе описаны композиции, которые содержат лиганды интегрина $\alpha\nu\beta 6$, и способы применения лигандов интегрина $\alpha\nu\beta 6$ и описанных в настоящем документе композиций.

Описанные в настоящем описании лиганды интегрина $\alpha\nu\beta 6$ имеют улучшенную стабильность по сравнению с другими известными связывающими интегрин $\alpha\nu\beta 6$ пептидами, например с натуральным пептидом RGD β ATLRQL (SEQ ID NO: 1). При том что имеют повышенную стабильность в сыворотке, новые описанные в настоящем описании лиганды $\alpha\nu\beta 6$ сохраняют связывание (аффинность к) интегрину $\alpha\nu\beta 6$.

В первом аспекте в настоящем раскрытии представлены сконструированные, не существующие в природе лиганды интегрина $\alpha\nu\beta 6$. В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрина $\alpha\nu\beta 6$ имеют общую формулу



в которой Z представляет аминотерминальный кэп (например, любой из аминотерминальных кэпов, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

Xaa¹ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области); а

Xaa² представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области).

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрина $\alpha\nu\beta 6$ имеют общую формулу



в которой Z представляет аминотерминальный кэп (например, любой из аминотерминальных кэпов, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

Xaa¹ представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Xaa² представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

J является необязательным, а если имеется, содержит одну или более (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30) L-α аминокислот (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислот (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), или α,α-дизамещенных аминокислот (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), или их комбинацию; и

R¹ является необязательным, а если имеется, содержит полиэтиленгликоль (PEG) и/или связывающую группу.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем описании лиганды интегрин αvβ6 могут содержать реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу и имеют общую формулу



в которой Z представляет аминотерминальный кэп (например, любой из аминотерминальных кэпов, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

Xaa¹ представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Xaa² представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

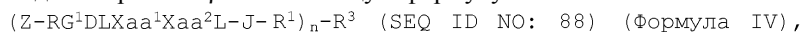
J является необязательным, а если имеется, содержит одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30) L-α аминокислот (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислот (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), или α,α-дизамещенных аминокислот (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), или их комбинацию;

R¹ является необязательным, а если имеется, содержит полиэтиленгликоль (PEG) и/или связывающую группу; и

R² содержит реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу.

В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин αvβ6 может быть конъюгирован с одной или более (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30) карго-молекулами (например, с любой из карго-молекул, описанных в настоящем документе или известных в данной области),

при этом лиганд интегрин $\alpha\nu\beta6$ имеет общую формулу



в которой Z представляет аминотерминальный кэп (например, любой из аминотерминальных кэпов, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

Xaa¹ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Xaa² представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

J является необязательным, а если имеется, содержит одну или более (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30) L- α аминокислот (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислот (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), или α,α -дизамещенных аминокислот (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), или их комбинацию;

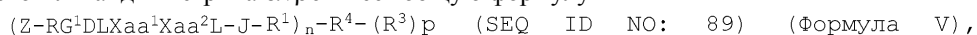
R¹ является необязательным, а если имеется, содержит полиэтиленгликоль (PEG) и/или связывающую группу; n представляет число больше 0 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30); и

R³ содержит одну или более карго-молекул.

В некоторых вариантах осуществления R³ содержит одну карго-молекулу. В некоторых вариантах осуществления R³ содержит более чем одну карго-молекулу.

В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин $\alpha\nu\beta6$ может быть конъюгирован с одной или более (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30) карго-молекулами (например, с любой из карго-молекул, описанных в настоящем документе или известных в данной области),

при этом лиганд интегрин $\alpha\nu\beta6$ имеет общую формулу



в которой Z представляет аминотерминальный кэп (например, любой из аминотерминальных кэпов, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

Xaa¹ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Xaa² представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

J является необязательным, а если имеется, содержит одну или более (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30) L- α аминокислот (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных

в данной области), L-β аминокислот (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенных аминокислот (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), или их комбинацию;

R¹ является необязательным, а если имеется, содержит полиэтиленгликоль (PEG) и/или связывающую группу; n представляет число больше 0 (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30);

R³ содержит одну или более карго-молекул;

p представляет число больше 0 (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30); и

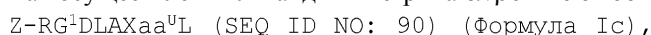
R⁴ является необязательным, а если имеется, содержит каркас и/или связывающую группу, которая содержит по меньшей мере одну точку присоединения для каждого лиганда и по меньшей мере одну точку присоединения для каждой карго-молекулы.

В некоторых вариантах осуществления R³ содержит одну карго-молекулу. В некоторых вариантах осуществления R³ содержит более чем одну карго-молекулу.

В рамках изобретения "аминотерминальный кэп" (в формулах в настоящем описании показан как "Z") содержит химический фрагмент, который способен увеличивать и/или иным образом улучшать характеристики устойчивости к протеазе и/или стабильности в сыворотке натурального пептида RGDLATL. Подобные улучшения можно определить, например, используя широко известные в данной области способы, включая без ограничения, например, путем определения периода полураспада лиганда интегрин αvβ6, конъюгата лиганд интегрин αvβ6-карго-молекула или содержащей лиганд интегрин αvβ6 композиции in vivo и/или in vitro. В некоторых вариантах осуществления Z предусматривает устойчивое к действию протеазы ацилирование, сульфонилирование или алкилирование N-терминального амина раскрытого в настоящем описании лиганда интегрин αvβ6. В некоторых вариантах осуществления аминотерминальным кэпом Z может быть алкил-CO, ArCO, алкил-SO₂, ArSO₂, алкильные или арильные группы. В некоторых вариантах осуществления алкильными группами могут быть либо линейные, либо разветвленные алифатические алкильные группы, а арильными группами могут быть либо ароматические, либо гетероароматические группы. В некоторых вариантах осуществления аминотерминальным кэпом Z может быть без ограничения CH₃CO, CH₃CH₂CO, CH₃(CH₂)₂CO, (CH₃)₂CHCO, CH₃(CH₂)₃CO, (CH₃)₂CHCH₂CO, CH₃CH₂CH(CH₃)CO, (CH₃)₃CCO, CH₃(CH₂)₄CO, CH₃SO₂, CH₃CH₂SO₂, CH₃(CH₂)₂SO₂, (CH₃)₂CHSO₂, CH₃(CH₂)₃SO₂, (CH₃)₂CHCH₂SO₂, CH₃CH₂CH(CH₃)SO₂, (CH₃)₃CSO₂, PhCO, PhSO₂, алкильная группа, имеющая 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 атомов углерода, метил, этил, пропил, бутил, пентил, NH₂NH, PEG, гуанидинил, CH₃OCH₂CH₂OCH₂CH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₅CH₂CH₂CO, CH₃OCH₂CH₂OCH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₂CH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₃CH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₄CH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₅CH₂CO, CH₃OCH₂CH₂OCO, CH₃O(CH₂CH₂O)₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₃CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₄CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₅CO, HOCH₂CH₂OCH₂CH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₅CH₂CH₂CO, HOCH₂CH₂OCH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₂CH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₃CH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₄CH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₅CH₂CO, HOCH₂CH₂OCO, HO(CH₂CH₂O)₂CO, HO(CH₂CH₂O)₃CO, HO(CH₂CH₂O)₄CO, HO(CH₂CH₂O)₅CO, CH₃CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₅CH₂CH₂CO, CH₃CH₂OCH₂CH₂OCH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₂CH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₃CH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₄CH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₅CH₂CO, CH₃CH₂OCH₂CH₂OCO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₃CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₄CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₅CO, CH₃OCH₂CH₂CO, HOCH₂CH₂CO или CH₃CH₂OCH₂CH₂CO.

В некоторых вариантах осуществления аминотерминальным кэпом Z является CH₃CO. В некоторых вариантах осуществления аминотерминальным кэпом Z является CH₃CH₂CO. В некоторых вариантах осуществления аминотерминальным кэпом Z является CH₃(CH₂)₂CO. В некоторых вариантах осуществления аминотерминальным кэпом Z является CH₃(CH₂)₃CO. В некоторых вариантах осуществления аминотерминальным кэпом Z является CH₃(CH₂)₄CO.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6 имеют общую формулу

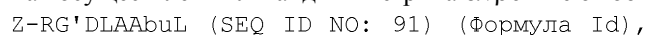


в которой Z, R, G¹, D и L каждый соответствует определению для формулы I в настоящем описании;

A представляет L-аланин; и

Xaa^U представляет нестандартную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6 имеют общую формулу



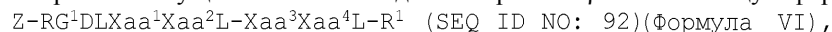
в которой Z, R, G¹, D и L каждый соответствует определению для формулы I в настоящем описании.

нии;

A представляет L-аланин; и

Abu представляет L- α -аминомасляную кислоту (2-аминомасляную кислоту).

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин $\alpha\nu\beta 6$ имеют общую формулу



в которой Z представляет аминотерминальный кэп (например, любой из аминотерминальных кэпов, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

Xaa¹ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

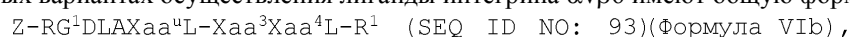
Xaa² представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Xaa³ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Xaa⁴ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области); и

R¹ является необязательным, а если имеется, содержит полиэтиленгликоль (PEG) и/или связывающую группу.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин $\alpha\nu\beta 6$ имеют общую формулу



в которой Z, R, G¹, D, L и R¹ каждый соответствует определению для формулы VI в настоящем описании;

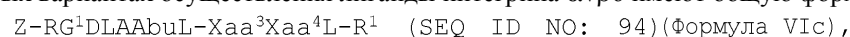
A представляет L-аланин;

Xaa^u представляет нестандартную аминокислоту;

Xaa³ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области); и

Xaa⁴ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области).

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин $\alpha\nu\beta 6$ имеют общую формулу



в которой Z, R, G¹, D, L и R¹ каждый соответствует определению для формулы VI в настоящем описании;

A представляет L-аланин;

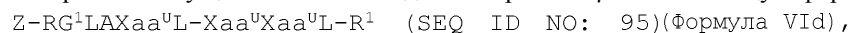
Abu представляет L- α -аминомасляную кислоту (2-аминомасляную кислоту);

Xaa³ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе

или известных в данной области); и

Хаа⁴ представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области).

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6 имеют общую формулу

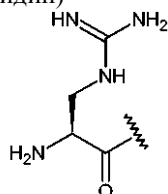


в которой Z, R, G¹, D, L и R¹ каждый соответствует определению для формулы VI в настоящем описании;

A представляет L-аланин; и

Хаа^U представляет нестандартную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления Z-R в любой из формул или лигандов в настоящем описании заменен R', причем R' представляет Дар(гуанидин)



В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6 имеют общую формулу



в которой R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

Хаа¹ представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Хаа² представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Хаа³ представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Хаа⁴ представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

R¹ является необязательным, а если имеется, содержит полиэтиленгликоль (PEG) и/или связывающую группу; и

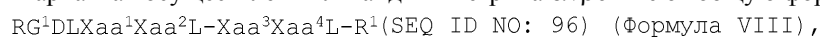
по меньшей мере один из Хаа¹, Хаа², Хаа³ и Хаа⁴ представляет нестандартную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6 имеют общую формулу



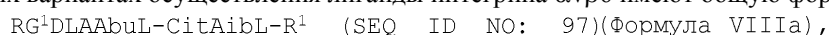
в которой по меньшей мере два из Хаа¹, Хаа², Хаа³ и Хаа⁴ представляют нестандартные аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6 имеют общую формулу



в которой по меньшей мере три из Хаа¹, Хаа², Хаа³ и Хаа⁴ представляют нестандартные аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6 имеют общую формулу



в которой R, G¹, D, L и R¹ каждый соответствует определению для формулы VIII в настоящем опи-

сании;

A представляет L-аланин;

Abu представляет L- α -аминомасляную кислоту (2-аминомасляную кислоту);

Cit представляет цитруллин, а Aib представляет α -аминоизомасляную кислоту (2-аминоизомасляную кислоту).

В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$ содержит, состоит из или по существу состоит из структуры по фиг. 1.

В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$ содержит, состоит из или по существу состоит из структуры по фиг. 2.

В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$ содержит, состоит из или по существу состоит из структуры по фиг. 3.

В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$ содержит, состоит из или по существу состоит из структуры по фиг. 4.

В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$ содержит, состоит из или по существу состоит из структуры по фиг. 5.

В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$ содержит, состоит из или по существу состоит из структуры по фиг. 6.

В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$ содержит, состоит из или по существу состоит из структуры по фиг. 7.

В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$ содержит, состоит из или по существу состоит из структуры по фиг. 8.

В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$ содержит, состоит из или по существу состоит из структуры по фиг. 9.

В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$ содержит, состоит из или по существу состоит из структуры по фиг. 10.

В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$ содержит, состоит из или по существу состоит из структуры по фиг. 11.

В некоторых вариантах осуществления любой из раскрытых в настоящем описании лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$ может быть связан с карго-молекулой, реакционноспособной группой и/или защищенной реакционноспособной группой. Реакционноспособную группу можно использовать для облегчения конъюгации лиганда интегрин $\alpha\nu\beta 6$ с молекулой, например одной или более карго-молекул (например, с любой из карго-молекул, описанных в настоящем документе или известных в данной области). Раскрытые в настоящем описании лиганды интегрин $\alpha\nu\beta 6$ могут повысить целенаправленное воздействие карго-молекулы на интегрин $\alpha\nu\beta 6$ или на экспрессирующую интегрин $\alpha\nu\beta 6$ клетку. Карго-молекулой может быть без ограничения фармацевтически активный ингредиент или соединение, лекарственное средство, пролекарство или имеющее терапевтическое значение вещество. В некоторых вариантах осуществления карго-молекулой может быть без ограничения малая молекула, антитело, фрагмент антитела, иммуноглобулин, моноклональное антитело, метка или маркер, липид, натуральная или модифицированная нуклеиновая кислота или полинуклеотид (например, олигомерное соединение, например, антисмысловый олигонуклеотид или средство РНКи), пептид, аптамер, полимер, полиамин, белок, токсин, витамин, полиэтиленгликоль, гаптен, диоксигенин, биотин, радиоактивный атом или молекула, или флуорофор. В некоторых вариантах осуществления карго-молекула содержит фармацевтически активный ингредиент, лекарственное средство или пролекарство. В некоторых вариантах осуществления карго-молекула в качестве фармацевтически активного ингредиента содержит олигомерное соединение. В некоторых вариантах осуществления карго-молекула в качестве фармацевтически активного ингредиента содержит средство РНКи.

В настоящем описании описано применение описанных лигандов $\alpha\nu\beta 6$ для целенаправленного воздействия карго-молекулы на экспрессирующую $\alpha\nu\beta 6$ клетку. Клетка может быть *in vitro*, *in situ*, *ex vivo* или *in vivo*.

В другом аспекте в настоящем раскрытии представлены композиции, которые содержат один или более сконструированных, не существующих в природе описанных в настоящем документе лигандов $\alpha\nu\beta 6$. Например, в некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие один или более раскрытых в настоящем описании лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$, содержат одно или более олигомерное соединение (соединения), например одно или более средство(а) РНКи, подлежащее(ие) доставке в клетку *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны композиции для доставки средства РНКи в клетку *in vivo*, причем средство РНКи конъюгировано с одним или более лигандами $\alpha\nu\beta 6$.

Описаны композиции, которые содержат один или более лигандов $\alpha\nu\beta 6$. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное средство. В некоторых вариантах осуществления композиция, которая содержит один или более лигандов $\alpha\nu\beta 6$, содержит

одно или более других фармацевтических веществ или фармацевтически активных ингредиентов или соединений.

В других вариантах осуществления композиции содержат лекарственные препараты, которые содержат один или более лигандов $\alpha\nu\beta 6$, которые описаны в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления лекарственный препарат, кроме того, содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

Композиции, которые содержат один или более раскрытых в настоящем описании лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$, можно доставлять *in vivo* или *in vitro*, например, в альвеолярные эпителиальные клетки I и II типа, бокаловидные клетки, секреторные эпителиальные клетки, ресничные эпителиальные клетки, эпителиальные клетки роговицы и конъюнктивы, эпителиальные клетки кожи, холангиоциты, энтероциты, эпителиальные клетки протоков, железистые эпителиальные клетки, почечные каналы и эпителиальные опухоли (карциномы).

В другом аспекте в настоящем раскрытии предоставлены способы, включающие применение одного или более лигандов $\alpha\nu\beta 6$ и/или композиций, которые описаны в настоящем описании, и при необходимости доставку раскрытых лигандов $\alpha\nu\beta 6$ и/или композиций в форме, подходящей для введения в качестве фармацевтического продукта. В других вариантах осуществления в раскрытии предоставлены способы получения лигандов и композиций, например лекарственных препаратов, описанных в настоящем документе.

Композиции, которые содержат один или более лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$, можно вводить субъектам *in vivo*, используя известные в данной области пути введения, подходящие для подобного введения с учетом карго-молекулы, которую необходимо ввести, включая, например, внутривенное, подкожное, внутривнутрибрюшинное, внутрикожное, трансдермальное, пероральное, подязычное, местное, интритриопухолевое, интраназальное или ингаляционное (готовые формы в виде аэрозоля или сухого порошка) введение. В некоторых вариантах осуществления композиции, которые содержат один или более лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$, можно вводить для системной доставки, например, путем внутривенного или подкожного введения. В некоторых вариантах осуществления композиции, которые содержат один или более лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$, можно вводить для локализованной доставки, например, путем ингаляционной доставки посредством ингалятора или небулайзера сухого порошка. В некоторых вариантах осуществления композиции, которые содержат один или более лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$, можно вводить для локализованной доставки путем местного введения.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы доставки одной или более требуемой карго-молекулы (молекул) в альвеолярную эпителиальную клетку I типа *in vivo*, причем способы включают введение субъекту одного или более лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$, конъюгированных с одной или более карго-молекулой.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы доставки одной или более требуемой карго-молекулы (молекул) в альвеолярную эпителиальную клетку II типа *in vivo*, причем способы включают введение субъекту одного или более лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$, конъюгированных с одной или более карго-молекулой.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы доставки одной или более требуемой карго-молекулы (молекул) в бокаловидную клетку *in vivo*, причем способы включают введение субъекту одного или более лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$, конъюгированных с одной или более карго-молекулой.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы доставки одной или более требуемой карго-молекулы (молекул) в секреторную эпителиальную клетку *in vivo*, причем способы включают введение субъекту одного или более лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$, конъюгированных с одной или более карго-молекулой. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы доставки одной или более требуемой карго-молекулы (молекул) в ресничную эпителиальную клетку *in vivo*, причем способы включают введение субъекту одного или более лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$, конъюгированных с одной или более карго-молекулой.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы доставки одной или более требуемой карго-молекулы (молекул) в роговичную эпителиальную клетку *in vivo*, причем способы включают введение субъекту одного или более лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$, конъюгированных с одной или более карго-молекулой.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы доставки одной или более требуемой карго-молекулы (молекул) в эпителиальную клетку конъюнктивы *in vivo*, причем способы включают введение субъекту одного или более лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$, конъюгированных с одной или более карго-молекулой.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы доставки одной или более требуемой карго-молекулы (молекул) в эпителиальную клетку кожи *in vivo*, причем способы включают введение субъекту одного или более лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$, конъюгированных с одной или более карго-молекулой.

интегрин $\alpha v\beta 6$, конъюгированных с одним или более средством РНКи. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы ингибирования экспрессии целевого гена в эпителиальной клетке протоков *in vivo*, причем способы включают введение субъекту средства РНКи, конъюгированного с одним или более лигандами, обладающими аффинностью к интегрину $\alpha v\beta 6$.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы доставки олигомерного соединения в железистую эпителиальную клетку *in vivo*, включающие введение субъекту одного или более лигандов интегрин $\alpha v\beta 6$, конъюгированных с одним или более олигомерным соединением. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы доставки средства РНКи в железистую эпителиальную клетку *in vivo*, включающие введение субъекту одного или более лигандов интегрин $\alpha v\beta 6$, конъюгированных с одним или более средством РНКи. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы ингибирования экспрессии целевого гена в железистой эпителиальной клетке *in vivo*, причем способы включают введение субъекту средства РНКи, конъюгированного с одним или более лигандами, обладающими аффинностью к интегрину $\alpha v\beta 6$.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы доставки олигомерного соединения в почечный канал *in vivo*, включающие введение субъекту одного или более лигандов интегрин $\alpha v\beta 6$, конъюгированных с одним или более олигомерным соединением. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы доставки средства РНКи в почечный канал *in vivo*, включающие введение субъекту одного или более лигандов интегрин $\alpha v\beta 6$, конъюгированных с одним или более средством РНКи. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы ингибирования экспрессии целевого гена в почечном канале *in vivo*, причем способы включают введение субъекту средства РНКи, конъюгированного с одним или более лигандами, обладающими аффинностью к интегрину $\alpha v\beta 6$.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы доставки олигомерного соединения в эпителиальную опухоль (карциному) *in vivo*, включающие введение субъекту одного или более лигандов интегрин $\alpha v\beta 6$, конъюгированных с одним или более олигомерным соединением. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы доставки средства РНКи в эпителиальную опухоль (карциному) *in vivo*, включающие введение субъекту одного или более лигандов интегрин $\alpha v\beta 6$, конъюгированных с одним или более средством РНКи. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы ингибирования экспрессии целевого гена в эпителиальной опухоли (карциноме) *in vivo*, причем способы включают введение субъекту средства РНКи, конъюгированного с одним или более лигандами, обладающими аффинностью к интегрину $\alpha v\beta 6$.

В рамках изобретения термин "алкил" относится к насыщенным алифатическим углеводородным группам, с неразветвленной или разветвленной цепью, имеющей от 1 до 10 атомов углерода, если не указано иное. Например, "C₁-C₆-алкил" содержит алкильные группы, имеющие 1, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода с линейным или разветвленным расположением. Неограничивающие примеры алкильных групп включают метил, этил, изопропил, трет-бутил, n-гексил. В рамках изобретения термин "аминоалкил" относится к алкильной группе согласно приведенному выше определению, замещенной в любой позиции одной или более аминогруппами, которые допускает нормальная валентность. Аминогруппы могут быть незамещенными, монозамещенными или дизамещенными. Неограничивающие примеры аминоалкильных групп включают аминметил, диметиламинметил и 2-аминопроп-1-ил.

В рамках изобретения термин "циклоалкил" означает насыщенную или ненасыщенную неароматическую углеводородную кольцевую группу, имеющую от 3 до 14 атомов углерода, если не указано иное. Неограничивающие примеры циклоалкильных групп включают без ограничения циклопропил, метилциклопропил, 2,2-диметилциклобутил, 2-этилциклопентил и циклогексил.

Циклоалкилы могут содержать множество спиро- или сочлененных колец. Циклоалкильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенными в любой позиции, в какой допускает нормальная валентность.

В рамках изобретения термин "алкенил" относится к неароматическому углеводородному радикалу, неразветвленному или разветвленному, содержащему по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод и имеющему от 2 до 10 атомов углерода, если не указано иное. В таких группах может иметься до пяти двойных связей углерод-углерод. Например, "C₂-C₆-алкенил" определяется, как алкенильный радикал, имеющий от 2 до 6 атомов углерода. Примеры алкенильных групп включают без ограничения этильную, пропильную, бутильную и циклогексильную. Неразветвленная, разветвленная или циклическая часть алкенильной группы может содержать двойные связи и необязательно является моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенной в любой позиции, в какой допускает нормальная валентность. Термин "циклоалкенил" означает моноциклическую углеводородную группу, имеющую определенное число атомов углерода и по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод.

В рамках изобретения термин "алкинил" относится к углеводородному радикалу, неразветвленному или разветвленному, содержащему от 2 до 10 атомов углерода, если не указано иное, и содержащему по меньшей мере одну тройную углерод-углеродную связь. Может иметься до 5 тройных углерод-углеродных связей. Таким образом, "C₂-C₆-алкинил" означает алкинильный радикал, имеющий от 2 до 6

атомов углерода. Примеры алкинильных групп включают без ограничения этинильную, 2-пропинильную и 2-бутинильную. Неразветвленная или разветвленная часть алкинильной группы может быть необязательно моно-, ди-, три-, тетра- или пента- замещенной в любой позиции, в какой допускает нормальная валентность.

В рамках изобретения "алкоксил" или "алкокси" относится к -О-алкильному радикалу, имеющему указанное число атомов углерода. Например, C₁₋₆-алкокси предполагает содержание C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ и C₆-алкокси групп. Например, C₁₋₈-алкокси предполагает содержание C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇ и C₈-алкокси групп. Примеры алкокси включают без ограничения метокси, этокси, n-пропокси, i-пропокси, n-бутокси, s-бутокси, t-бутокси, n-пентокси, s-пентокси, n-гептокси и n-октокси.

В рамках изобретения "кето" относится к любой алкильной, алкенильной, алкинильной, циклоалкильной, циклоалкенильной, гетероциклической, гетероарильной или арильной группе согласно определению в настоящем описании, соединенной посредством карбонильного мостика. Примеры кето групп включают без ограничения алканоильную (например, ацетильную, пропиоильную, бутаноильную, пентаноильную или гексаноильную), алкеноильную (например, акрилоильную) алкиноильную (например, этиноильную, пропиоильную, бутиноильную, пентиноильную или гексаноильную), арилоильную (например, бензоильную), гетероарилоильную (например, пирролоильную, имидазоильную, квинолиноильную или пиридилоильную).

В рамках изобретения "алкоксикарбонильная" относится к любой алкокси группе согласно приведенному выше определению, соединенной посредством карбонильного мостика (т.е. -C(O)O-алкила). Примеры алкоксикарбонильных групп включают без ограничения метоксикарбонильную, этоксикарбонильную, изопропоксикарбонильную, n-пропоксикарбонильную, t-бутоксикарбонильную, бензилоксикарбонильную или n-пентоксикарбонильную.

В рамках изобретения "арилоксикарбонильная" относится к любой арильной группе согласно определению в настоящем описании, соединенной посредством оксикарбонильного мостика (т.е. -C(O)O-арила). Примеры арилоксикарбонильных групп включают без ограничения феноксикарбонильную и нафтилоксикарбонильную.

В рамках изобретения "гетероарилоксикарбонильная" относится к любой гетероарильной группе согласно определению в настоящем описании, соединенной посредством оксикарбонильного мостика (т.е. -C(O)O-гетероарила). Примеры гетероарилоксикарбонильных групп включают без ограничения 2-пиридилоксикарбонильную, 2-оксазолилоксикарбонильную, 4-тиазолилоксикарбонильную или пиримидинолоксикарбонильную.

В рамках изобретения "арильное" или "ароматическое" означает любое стабильное моноциклическое или полициклическое углеродное кольцо до 6 атомов в каждом кольце, причем по меньшей мере одно кольцо является ароматическим. Примеры арильных групп включают без ограничения фенильную, нафтильную, антраценильную, тетрагидронафтильную, инданильную и бифенильную. В случаях когда арильный заместитель бициклический, а одно кольцо неароматическое, должно быть понятно, что соединение происходит посредством ароматического кольца. Арильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенными в любой позиции, в какой допускает нормальная валентность.

В рамках изобретения термин "гетероарил" отображает стабильное моноциклическое или полициклическое кольцо до 7 атомов в каждом кольце, причем по меньшей мере одно кольцо является ароматическим и содержит от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Примеры гетероарильных групп включают без ограничения акридинильную, карбазоильную, циннолинильную, хиноксалинильную, пирразоильную, индолильную, бензотриазоильную, фуранильную, тиенильную, бензотиенильную, бензофуранильную, бензимидазоильную, бензоксазоильную, хинолинильную, изохинолинильную, дигидроизоиндолонильную, имидазопиридилильную, изоиндолонильную, индазоильную, оксазоильную, оксадиазоильную, изоксазоильную, индолильную, пиразинильную, пиридазинильную, пиридилильную, пиримидинильную, пирролильную и тетрагидрохинолиновую. "Гетероарил" также подразумевает содержание производного N-оксида любого азотсодержащего гетероарила. В случаях когда гетероарильный заместитель бициклический, а одно кольцо неароматическое или не содержит гетероатомы, должно быть понятно, что соединение происходит посредством ароматического кольца или посредством гетероатома, содержащего кольцо. Гетероарильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенными в любой позиции, в какой допускает нормальная валентность.

В рамках изобретения термин "гетероцикл", "гетероциклический" или "гетероцикл" означает 3-14-членный ароматический или неароматический гетероцикл, содержащий от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S, включая полициклические группы. В рамках изобретения термин "гетероциклический" также считается синонимом терминам "гетероцикл" и "гетероцикл" и подразумевает также наличие тех же определений, которые изложены в настоящем описании. "Гетероцикл" включает упомянутые выше гетероарилы, а также его дигидро и тетрагидро аналоги. Примеры гетероциклических групп включают без ограничения азетидинильную, бензоимидазоильную, бензоимидазоильную, бензофуранильную, бензофуразинильную, бензопиразоильную, бензотриазоильную, бензотиофенильную, бен-

зоксазолильную, карбазолильную, карболинильную, циннолинильную, фуранильную, имидазолильную, индолинильную, индолильную, индолазинильную, индазолильную, изобензофуранильную, изоиндолильную, изохинолильную, изотиазолильную, изоксазолильную, нафтиридилильную, оксадиазолильную, оксооксазолидинильную, оксазолильную, оксазолиновую, оксопиперазинильную, оксопирролидинильную, оксоморфолинильную, изоксазолиновую, оксетанильную, пиранильную, пиразинильную, пиразолильную, пиридазинильную, пиридопиридинильную, пиридазинильную, пиридилную, пиридинонильную, пиримидильную, пиримидинонильную, пирролильную, хиназолинильную, хинолильную, хинноксалинильную, тетрагидропиранильную, тетрагидрофуранильную, тетрагидротииопиранильную, тетрагидроизохинолинильную, тетразолильную, тетразолопиридильную, тиадиазолильную, тиазолильную, тиенильную, триазолильную, 1,4-диоксанильную, гексагидроазепинильную, пиперазинильную, пиперидинильную, пиридин-2-онильную, пирролидинильную, морфолинильную, тиоморфолинильную, дигидробензоимидазолильную, дигидробензофуранильную, дигидробензотиофенильную, дигидробензоксазолильную, дигидрофуранильную, дигидроимидазолильную, дигидроиндолильную, дигидроизооксазолильную, дигидроизотиазолильную, дигидрооксадиазолильную, дигидрооксазолильную, дигидропиразинильную, дигидропиразолильную, дигидропиридинильную, дигидропиримидинильную, дигидропирролильную, дигидрохинолинильную, дигидротетразолильную, дигидротиадиазолильную, дигидротиазолильную, дигидротииенильную, дигидротриазолильную, дигидроазетидинильную, диоксидотиоморфолинильную, метилendioксибензоильную, тетрагидрофуранильную и тетрагидротииенильную и их N-оксиды. Присоединение гетероциклического заместителя может происходить посредством атома углерода или посредством гетероатома. Гетероциклические группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенными в любой позиции, в какой допускает нормальная валентность.

В рамках изобретения термины "лечить", "лечение" и т.п. означают способы или этапы, предпринимаемые, чтобы обеспечить освобождение или уменьшение числа, тяжести и/или частоты одного или более симптомов заболевания или состояния у субъекта.

Если не указано иное, применение символа, который использован в настоящем описании, означает, что с ним может быть связана любая группа или группы, что соответствует объему изобретений, описанных в настоящем документе.

В рамках изобретения термин "изомеры" относится к соединениям, которые имеют идентичные молекулярные формулы, но которые отличаются по своей природе или последовательности связывания их атомов или по расположению их атомов в пространстве. Изомеры, которые отличаются по расположению их атомов в пространстве, называются "стереоизомеры".

Стереоизомеры, которые не являются зеркальными отображениями друг друга, называются "диастереоизомеры", а стереоизомеры, которые являются несовпадающими при наложении зеркальными отображениями, называются "энантиомеры" или иногда оптические изомеры. Атом углерода, связанный с четырьмя неидентичными заместителями, называется "хиральный центр".

В рамках изобретения связывающей группой является один или более атомов, которые связывают одну молекулу или часть молекулы с другой со второй молекулой или второй частью молекулы. В данной области термины связывающая группа и спейсеры иногда используют взаимозаменяемо. Аналогично, как используют в данной области, термин каркас иногда используют взаимозаменяемо со связывающей группой. В некоторых вариантах осуществления связывающая группа может содержать расщепляемую пептидом связывающую группу. В некоторых вариантах осуществления связывающая группа может содержать или состоять из пептида FCitFP (SEQ ID NO: 131).

В рамках изобретения термин "связанный" при ссылке на соединение между двумя молекулами означает, что две молекулы соединены ковалентной связью или что две молекулы связаны с помощью нековалентных связей (например, водородных связей или ионных связей). В некоторых примерах, где термин "связанный" относится к ассоциации между двумя молекулами с помощью нековалентных связей, ассоциация между двумя разными молекулами имеет K_D менее 1×10^{-4} М (например, менее чем 1×10^{-5} М, менее чем 1×10^{-6} М или менее чем 1×10^{-7} М) в физиологически приемлемом буфере (например, фосфатном буферном солевом растворе). Если не указано, термин "связанный" в рамках изобретения может относиться к связи между первым соединением и вторым соединением либо с любыми промежуточными атомами или группами атомов, либо без оных.

В рамках изобретения "стандартные аминокислоты" или "натуральные аминокислоты" включают аланин, цистеин, аспарагиновую кислоту (аспартат), глутаминовую кислоту (глутамат), фенилаланин, глицин, гистидин, изолейцин, лизин, лейцин, метионин, аспарагин, пролин, глутамин, аргинин, серин, треонин, валин, триптофан, тирозин.

В рамках изобретения "нестандартные аминокислоты" включают без ограничения селеноцистеин, пирролизин, N-формилметионин, гидроксипролин, селенометионин, α -аминоизомасляную кислоту (Aib), L- α -аминомасляную кислоту (Abu), α,γ -диаминомасляную кислоту, дегидроаланин, норлейцин, аллоизолейцин, t-лейцин, α -амино-n-гептановую кислоту, α,β -диаминопропионовую кислоту, β -N-оксалил- α,β -диаминопропионовую кислоту, аллотреонин, гомоцистеин, гомосерин, β -гомо-аланин (β 3-hA), изовалин, норвалин (Nva), цитруллин (Cit), орнитин, α -метиласпартат (α MeD), α -метиллейцин (α MeL),

N-метилаланин, N-метилглицин (NMeG), N-метиллейцин (NMeL), β -циклогексилаланин (Cha), N-этилаланин, N,N- ϵ -диметиллизин (K(Me)₂), диметиларгинин (R(Me)₂), Dap(Ac), n-алкилированные L- α аминокислоты и другие аналоги аминокислот или миметики аминокислот, которые функционируют аналогично существующим в природе аминокислотам.

В рамках изобретения, если конкретно не указано, что в структуре имеется особая конформация, для каждой структуры, в которой имеются ассиметричные центры и которые, таким образом, являются причиной энантиомеров, диастереомеров или других стереоизомерных конфигураций, каждая раскрытая в настоящем описании структура предназначена представлять все подобные возможные изомеры, включая их оптически чистые и рацемические формы. Например, раскрытые в настоящем описании структуры предназначены охватывать смеси диастереомеров, а также отдельные стереоизомеры.

Рядовой специалист в данной области легко поймет и будет иметь в виду, что раскрытые в настоящем описании соединения и композиции могут иметь некоторые атомы (например, атомы N, O или S) в протонированном или депротонированном состоянии в зависимости от окружающих условий, в которых находится соединение или композиция. Соответственно в рамках изобретения раскрытые в настоящем описании структуры предусматривают, что некоторые функциональные группы, такие как, например, OH, SH или NH, могут быть протонированными или депротонированными. Настоящее раскрытие предназначено охватывать раскрытые соединения и композиции независимо от их состояния протонирования на основе pH окружающих условий, как будет легко понятно рядовому специалисту в данной области.

Как использовано в формуле изобретения в настоящем описании, фраза "состоящий из" исключает любой элемент, этап или ингредиент не указанный в формуле изобретения. При использовании в формуле изобретения в настоящем описании фраза "состоящий по существу из" ограничивает объем формулы изобретения определенными материалами или этапами и элементами, которые не существенного влияния на основные и новые характеристики (характеристики) заявленного изобретения.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое обычно понятно рядовому специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при практическом применении или тестировании настоящего изобретения можно использовать способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем описании способам и материалам, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие упомянутые в настоящем описании ссылки полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущество. Кроме того, материалы, способы и примеры являются иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Фармакокинетика является общей проблемой для пептидных лекарственных средств и фармацевтических композиций, которые содержат пептиды. Многие пептиды, например, циркулируют в крови не более чем несколько минут вследствие ферментативного разложения. Это часто значительно уменьшает или даже предотвращает их полезность в качестве терапевтических средств или в качестве компонентов лекарственных средств.

Исследования стабильности в различных сывороточных препаратах (например, измерение *in vitro* разложения пептидов в сыворотке и/или плазме) стали важными скрининговыми исследованиями при разработке пептидных лекарственных средств. Как показали, среди прочего подобные исследования, раскрытые в настоящем описании лиганды интегрин $\alpha v \beta 6$, являются стабильными в сыворотке и обладают аффинностью к интегрину $\alpha v \beta 6$ или могут связываться с ними.

Другие признаки и преимущества изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и из формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена химическая структура примера раскрытого в настоящем описании лиганда интегрин $\alpha v \beta 6$, синтезированного в виде сложного тетрафторфенилового (TFP) эфира. Лиганд интегрин $\alpha v \beta 6$ содержит PEG₂₀ (двадцать (20) единиц этиленоксида (CH₂-CH₂-O)) и связывающую группу FCitFP.

На фиг. 2 представлена химическая структура примера раскрытых в настоящем описании лигандов интегрин $\alpha v \beta 6$, синтезированных в виде сложного тетрафторфенилового (TFP) эфира. Лиганд интегрин $\alpha v \beta 6$ содержит PEG₅ (пять (5) единиц этиленоксида (CH₂-CH₂-O)).

На фиг. 3 представлена химическая структура примера раскрытого в настоящем описании лиганда интегрин $\alpha v \beta 6$, который содержит CF₃CO в качестве аминотерминального кэпа, PEG₂₀ и связывающую группу FCitFP.

На фиг. 4 представлена химическая структура примера раскрытого в настоящем описании лиганда интегрин $\alpha v \beta 6$, который содержит CF₃CO в качестве аминотерминального кэпа и PEG₅.

На фиг. 5 представлена химическая структура примера раскрытого в настоящем описании лиганда интегрин $\alpha v \beta 6$ без аминотерминального кэпа. Лиганд интегрин $\alpha v \beta 6$ содержит PEG₂₀ и связывающую группу FCitFP.

На фиг. 6 представлена химическая структура примера раскрытого в настоящем описании лиганда

интегрин $\alpha v \beta 6$ без аминотерминального кэпа. Лиганд интегрин $\alpha v \beta 6$ содержит PEG_5 .

На фиг. 7 представлена химическая структура примера раскрытого в настоящем описании лиганда интегрин $\alpha v \beta 6$, который в качестве аминотерминального кэпа содержит CH_3CO .

На фиг. 8 представлена химическая структура примера раскрытого в настоящем описании лиганда интегрин $\alpha v \beta 6$, который содержит CH_3CO в качестве аминотерминального кэпа, PEG_{20} и связывающую группу FCitFP. Кроме того, в структуре показан фрагмент PEG 20 килодальтон (кДа).

На фиг. 9 представлена химическая структура примера раскрытого в настоящем описании лиганда интегрин $\alpha v \beta 6$, который содержит CH_3CO в качестве аминотерминального кэпа, PEG_{20} и связывающую группу FCitFP. Кроме того, в структуре показан фрагмент PEG 20 килодальтон (кДа) и показана структура, связанная с олигомерным соединением, таким как средство РНКи.

На фиг. 10 представлена химическая структура примера раскрытого в настоящем описании триден-татного лиганда интегрин $\alpha v \beta 6$, который содержит CH_3CO в качестве аминотерминального кэпа и PEG_5 , связанный с каркасом бис-глутаминовой кислоты и реакционноспособной группой PEG-азидом.

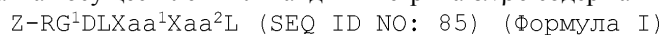
На фиг. 11 представлена химическая структура примера раскрытого в настоящем описании триден-татного лиганда интегрин $\alpha v \beta 6$, который содержит CH_3CO в качестве аминотерминального кэпа и PEG_5 , связанный с каркасом бис-глутаминовой кислоты.

На фиг. 12 представлен график, показывающий тотальную экспрессию альфа-ENaC в легком крысы у крыс Sprague-Dawley со средством голый РНКи к альфа-ENaC без нацеливающего лиганда и с тем же средством РНКи к альфа-ENaC, конъюгированным с поли-L-лизиновым каркасом и с лигандом интегрин $\alpha v \beta 6$, представленным структурой по фиг. 4.

Подробное описание

В настоящем документе описаны новые, сконструированные, не существующие в природе пептидные лиганды интегрин $\alpha v \beta 6$, имеющие стабильность в сыворотке и аффинность к интегринам $\alpha v \beta 6$. Лиганды интегрин $\alpha v \beta 6$ можно использовать для целенаправленного воздействия на экспрессирующие интегрин $\alpha v \beta 6$ клетки *in vitro*, *in situ*, *ex vivo* и/или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин $\alpha v \beta 6$ могут быть конъюгированы с одной или более карго-молекулами для направления карго-молекул в экспрессирующие интегрин $\alpha v \beta 6$ клетки *in vitro*, *in situ*, *ex vivo* и/или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления карго-молекулы содержат или состоят из фармацевтически активных соединений. В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем описании лиганды интегрин $\alpha v \beta 6$ конъюгированы с карго-молекулами для направления карго-молекул в эпителиальные клетки *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин $\alpha v \beta 6$ содержат



в которой Z представляет аминотерминальный кэп (например, любой из аминотерминальных кэпов, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

R представляет L-аргинин;

G^1 представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

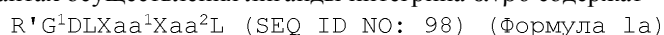
L представляет L-лейцин;

Xaa^1 представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α, α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α, α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области); а

Xaa^2 представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α, α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α, α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области).

В некоторых вариантах осуществления аминотерминальный кэп (Z) в формуле I содержит CH_3CO (также называемый в настоящем описании 'Ac'). В некоторых вариантах осуществления аминотерминальным кэпом (Z) в формуле I является CH_3CO .

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин $\alpha v \beta 6$ содержат



в которой R' представляет Dар(гуанидин); а

G^1 , D, L, Xaa^1 и Xaa^2 каждый соответствует определению для формулы I в настоящем описании.

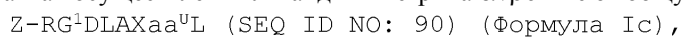
В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин $\alpha v \beta 6$ имеют общую формулу



в которой Z, R, G^1 , D, L и Xaa^1 каждый соответствует определению для формулы I в настоящем описании; и

Хаа^u представляет нестандартную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин $\alpha\nu\beta 6$ имеют общую формулу



в которой Z, R, G¹, D и L каждый соответствует определению для формулы I в настоящем описании;

A представляет L-аланин; а

Хаа^u представляет нестандартную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления описаны лиганды интегрин $\alpha\nu\beta 6$, содержащие



в которой Z представляет аминотерминальный кэп (например, любой из аминотерминальных кэпов, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

Хаа¹ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Хаа² представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

J является необязательным, а если имеется, содержит одну или более (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30) L- α аминокислот (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислот (например, любую из L- β аминокислот описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенных аминокислот (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), или их комбинацию; а

R¹ является необязательным, а если имеется, содержит PEG и/или связывающую группу.

В некоторых вариантах осуществления L связан с J посредством амидной связи.

В некоторых вариантах осуществления описаны лиганды интегрин $\alpha\nu\beta 6$, содержащие

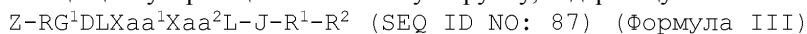


в которой R¹ представляет Дар(гуанидин); а

G¹, D, L, Хаа¹, Хаа², J и R¹ каждый соответствует определению для формулы II в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления L связан с J посредством амидной связи.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин $\alpha\nu\beta 6$ могут содержать реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу, содержащую



в которой Z представляет аминотерминальный кэп (например, любой из аминотерминальных кэпов, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

Хаа¹ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Хаа² представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

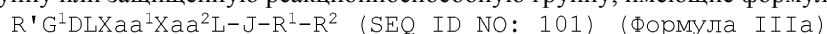
J является необязательным, а если имеется, содержит одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30) L- α аминокислот (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислот (например, любую из L- β аминокислот описанных в настоящем документе или известных в данной области), или α,α -дизамещенных аминокислот (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), или их комбинацию;

R¹ является необязательным, а если имеется, содержит PEG и/или связывающую группу; а

R² содержит реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу.

Реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу можно использовать для соединения лиганда интегрин $\alpha v \beta 6$ с интересующей молекулой, т.е. с карго-молекулой. В некоторых вариантах осуществления L связан с J посредством амидной связи.

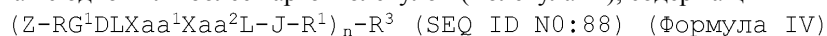
В некоторых вариантах осуществления синтезируют лиганды интегрин $\alpha v \beta 6$, имеющие реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу, имеющие формулу



в которой R' представляет Дар(гуанидин); а

G¹, D, L, Xaa¹, Xaa², J, R¹ и R² каждый соответствует определению для формулы III в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления один или более лиганд (лиганды) интегрин $\alpha v \beta 6$ может быть конъюгирован с одной или более карго-молекулой (молекулами), содержащими



в которой Z представляет аминотерминальный кэп (например, любой из аминотерминальных кэпов, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспарат);

L представляет L-лейцин;

Xaa¹ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Xaa² представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

J является необязательным, а если имеется, содержит одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30) L- α аминокислот (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислот (например, любую из L- β аминокислот описанных в настоящем документе или известных в данной области), или α,α -дизамещенных аминокислот (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), или их комбинацию;

R¹ является необязательным, а если имеется, содержит полиэтиленгликоль (PEG) и/или связывающую группу;

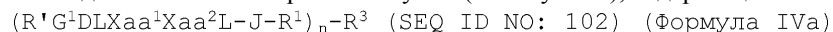
n представляет число больше 0 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30); а

R³ содержит карго-молекулу.

В некоторых вариантах осуществления L связан с J посредством амидной связи. В некоторых вариантах осуществления карго-молекулой может быть любая молекула, которую требуется нацелить на экспрессирующую интегрин $\alpha v \beta 6$ клетку. В некоторых вариантах осуществления n представляет целое число между 1 и 4. В некоторых вариантах осуществления n составляет 1. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3. Когда n составляет 1, лиганд интегрин $\alpha v \beta 6$ в настоящем описании может называться "монодентатный" лиганд интегрин $\alpha v \beta 6$. Когда n составляет 3, лиганд интегрин $\alpha v \beta 6$ в настоящем описании может называться "тридентатный" лиганд интегрин $\alpha v \beta 6$. Когда n составляет 2, лиганд интегрин $\alpha v \beta 6$ в настоящем описании может называться "бидентатный" лиганд интегрин $\alpha v \beta 6$. Когда

n составляет 4, лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$ в настоящем описании может называться "тетрадентатный" лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$.

В некоторых вариантах осуществления один или более лиганд (лиганды) интегрин $\alpha\nu\beta 6$ может быть конъюгирован с одной или более карго-молекулой (молекулами), содержащими

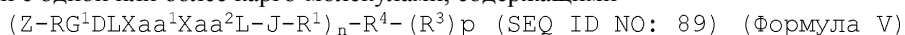


в которой R^1 представляет Dар(гуанидин); а

G^1 , D, L, Xaa¹, Xaa², J, R^1 , N и R^3 каждый соответствует определению для формулы IV в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления L связан с J посредством амидной связи. В некоторых вариантах осуществления n представляет целое число между 1 и 4. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3. В некоторых вариантах осуществления карго-молекулой может быть любая молекула, которую требуется нацелить на экспрессирующую интегрин $\alpha\nu\beta 6$ клетку.

В некоторых вариантах осуществления один или более лигандов интегрин $\alpha\nu\beta 6$ может быть конъюгирован с одной или более карго-молекулами, содержащими



в которой Z представляет аминотерминальный кэп (например, любой из аминотерминальных кэпов, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

R представляет L-аргинин;

G^1 представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

Xaa¹ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Xaa² представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

J является необязательным, а если имеется, содержит одну или более (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30) L- α аминокислот (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислот (например, любую из L- β аминокислот описанных в настоящем документе или известных в данной области), или α,α -дизамещенных аминокислот (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), или их комбинацию;

R^1 является необязательным, а если имеется, содержит PEG и/или связывающую группу;

n представляет число больше 0 (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30);

R^4 является необязательным, а если имеется, содержит каркас и/или связывающую группу, которая содержит по меньшей мере одну точку присоединения для каждого имеющегося лиганда (т.е. по меньшей мере число точек присоединения, равное n) и по меньшей мере одну точку присоединения для каждой имеющейся карго-молекулы (т.е. По меньшей мере число точек присоединения, равное p);

p представляет число больше 0 (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30); а

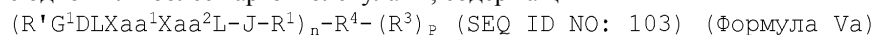
R^3 содержит одну или более карго-молекул.

В некоторых вариантах осуществления L связан с J посредством амидной связи. В некоторых вариантах осуществления карго-молекулой может быть любая молекула, которую требуется нацелить на экспрессирующую интегрин $\alpha\nu\beta 6$ клетку.

Раскрытые в настоящем описании лиганды интегрин $\alpha\nu\beta 6$ могут содержать один или более каркасов. Каркасы, также иногда называемые в данной области связывающими группами или линкерами, можно использовать для облегчения связывания одной или более карго-молекул с одним или более раскрытыми в настоящем описании лигандами интегрин $\alpha\nu\beta 6$. Подходящие каркасы, совместимые с раскрытыми в настоящем описании лигандами, широко известны в данной области. Неограничивающие примеры каркасов, которые можно использовать с раскрытыми в настоящем описании лигандами интег-

рина $\alpha\beta 6$, включают без ограничения полимеры (например, полимеры полиакрилатов, полимеры сложных поливиниловых эфиров и т.д.), полимеры аминокислот (например, бис-глутаминовую кислоту, бис-лизин, поли-L-лизин PLL и т.д.) и цистеин. В некоторых вариантах осуществления каркасы могут обеспечивать дополнительные требуемые свойства в дополнение к функционированию только в качестве линкера, например, улучшая фармакокинетические (ФК) свойства.

В некоторых вариантах осуществления один или более лигандов интегрин $\alpha\beta 6$ может быть конъюгирован с одной или более карго-молекулами, содержащими



в которой R^1 представляет Dap(гуанидин); а

G^1 , D, L, Xaa^1 , Xaa^2 , J, R^1 , n, R^4 , p и R^3 каждый соответствует определению для формулы V в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления L связан с J посредством амидной связи. Карго-молекулой может быть любая молекула, которую требуется нацелить на экспрессирующую интегрин $\alpha\beta 6$ клетку.

В некоторых вариантах осуществления J в любой из формул настоящего описания содержит одну, две, три или более чем три L- α аминокислоты, L- β аминокислоты или α, α -дизамещенных аминокислоты. Одна, две, три или более чем три аминокислоты представляют собой независимо существующие в природе L- α аминокислоты, существующие в природе протеиногенные аминокислоты, существующие в природе стандартные аминокислоты (т.е. 20 аминокислот, которые кодируются непосредственно кодами универсального генетического кода, также называемые кодируемые аминокислоты канонических аминокислот), или нестандартные аминокислоты (также называемые ненатуральные, неcodируемые или неканонические аминокислоты).

Стандартные или натуральные аминокислоты включают аланин, цистеин, аспарагиновую кислоту (аспартат), глутаминовую кислоту (глутамат), фенилаланин, глицин, гистидин, изолейцин, лизин, лейцин, метионин, аспарагин, пролин, глутамин, аргинин, серин, треонин, валин, триптофан и тирозин.

Нестандартные аминокислоты включают без ограничения селеноцистеин, пирролизин, N-формилметионин, гидроксипролин, селенометионин, α -аминоизомасляную кислоту (Aib), L- α -аминомасляную кислоту (Abu), α, γ -диаминотмасляную кислоту, дегидроаланин, норлейцин, аллоизолейцин, t-лейцин, α -амино-n-гептановую кислоту, α, β -диаминопропионовую кислоту, β -N-оксалил- α, β -диаминопропионовую кислоту, аллотреонин, гомоцистеин, гомосерин, β -гомо-аланин ($\beta 3$ -hA), изовалин, норвалин (Nva), цитруллин (Cit), орнитин, α -метиласпартат (α MeD), α -метиллейцин (α MeL), N-метилаланин, N-метилглицин ($N_{Me}G$), N-метиллейцин ($N_{Me}L$), β -циклогексилаланин (Cha), N-этилаланин, N,N- ϵ -диметиллизин ($K(Me)_2$), диметиларгинин ($R(Me)_2$), Dap(Ac), n-алкилированные L- α аминокислоты и другие аналоги аминокислот или миметики аминокислот, которые функционируют аналогично существующим в природе аминокислотам.

В некоторых вариантах осуществления J содержит по меньшей мере одну нестандартную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления J представляет собой или содержит Aib, Cit, CitAib, CitAibL, CitE, CitF, CitG, CitK, CitP, CitQ, CitQL, EAib, FAib, KAib, PAib, QAib, RabuL, RAibL, RCitL, RDap(Ac)L, RLQ или RNvaL.

В некоторых вариантах осуществления J в любой из описанных в настоящем документе формул содержит или состоит из $Xaa^3 Xaa^4 L$, причем

L представляет L-лейцин;

Xaa^3 представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α, α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α, α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области); и

Xaa^4 представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α, α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α, α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области).

В некоторых вариантах осуществления J представляет собой или содержит $Xaa^3 Xaa^4$, причем

Xaa^3 представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α, α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α, α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области); и

Xaa^4 представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α, α -дизамещенную

аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области).

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрина $\alpha v \beta 6$ содержат

$$\text{Z-RG}^1\text{-DLXaa}^1\text{Xaa}^2\text{LXaa}^3\text{Xaa}^4\text{L-R}^1 \quad (\text{SEQ ID NO: 92}) \quad (\text{Формула VI})$$

в которой Z представляет аминотерминальный кэп (например, любой из аминотерминальных кэпов, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

Д представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

Хаа¹ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Хаа² представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Хаа³ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Хаа⁴ представляет L- α аминокислоту (например, любую из L- α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L- β аминокислоту (например, любую из L- β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α -дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α -дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области): а

R¹ является необязательным, а если имеется, содержит PEG и/или связывающую группу.

В некоторых вариантах осуществления Хаа¹ представляет L-α аминокислоту, L-β аминокислоту или α,α-дизамещенную аминокислоту. Хаа¹ может быть без ограничения встречающаяся в природе L-α аминокислота, встречающаяся в природе протениогенная аминокислота, встречающаяся в природе стандартная аминокислота (т.е. 20 аминокислот, которые кодируются непосредственно кодами универсального генетического кода, также называемые кодируемые аминокислоты канонических аминокислот) или нестандартная (также называемая ненатуральная, неcodируемая или неканоническая) аминокислота.

В некоторых вариантах осуществления Хаа² представляет L-α аминокислоту, L-β аминокислоту или α,α-дизамещенную аминокислоту. Хаа² может быть без ограничения встречающаяся в природе L-α аминокислота, встречающаяся в природе протеиногенная аминокислота, встречающаяся в природе стандартная аминокислота (т.е. 20 аминокислот, которые кодируются непосредственно кодоном универсального генетического кода, также называемые кодируемые аминокислоты канонических аминокислот) или нестандартная (также называемая ненатуральная, неcodируемая или неканоническая) аминокислота.

В некоторых вариантах осуществления Хаа³ представляет L-α аминокислоту, L-β аминокислоту или α,α-дизамещенную аминокислоту. Хаа³ может быть без ограничения встречающаяся в природе L-α аминокислота, встречающаяся в природе протеиногенная аминокислота, встречающаяся в природе стандартная аминокислота (т.е. 20 аминокислот, которые кодируются непосредственно кодами универсального генетического кода, также называемые кодируемые аминокислоты канонических аминокислот) или нестандартная (также называемая ненатуральная, неcodируемая или неканоническая) аминокислота.

В некоторых вариантах осуществления Хаа⁴ представляет L-α аминокислоту, L-β аминокислоту или α,α-дизамещенную аминокислоту. Хаа⁴ может быть без ограничения встречающаяся в природе L-α аминокислота, встречающаяся в природе протеиногенная аминокислота, встречающаяся в природе стандартная аминокислота (т.е. 20 аминокислот, которые кодируются непосредственно кодами универсального генетического кода, также называемые кодируемые аминокислоты канонических аминокислот) или нестандартная (также называемая ненатуральная, неcodируемая или неканоническая) аминокислота.

В некоторых вариантах осуществления Хаа¹ или Хаа² представляет нестандартную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления Хаа¹ представляет нестандартную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления Хаа² представляет нестандартную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления как Хаа¹, так и Хаа² представляют нестандартные аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления Хаа¹ и/или Хаа² представляют Abu. В некоторых вариантах

осуществления Xaa^1 представляет Abu. В некоторых вариантах осуществления Xaa^2 представляет Abu.

В некоторых вариантах осуществления Xaa^1 или Xaa^2 не имеют заряда. В некоторых вариантах осуществления Xaa^1 не имеет заряда. В некоторых вариантах осуществления Xaa^2 не имеет заряда. В некоторых вариантах осуществления Xaa^1 и Xaa^2 не имеют заряда.

В некоторых вариантах осуществления Xaa^1 не имеет заряда, а Xaa^2 представляет нестандартную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления Xaa^2 не имеет заряда, а Xaa^1 представляет нестандартную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления Xaa^1 не имеет заряда, а Xaa^2 представляет Abu. В некоторых вариантах осуществления Xaa^2 не имеет заряда, а Xaa^1 представляет Abu.

В некоторых вариантах осуществления Xaa^1Xaa^2 представляет AAbu, KAbu, EAbu, FAbu, QAbu, GAbu, PAbu, AK, AE, AF, AQ, AG и AP, причем A представляет L-аланин, Abu представляет L- α -аминомасляную кислоту, K представляет L-лизин, E представляет L-глутаминовую кислоту (глутамат), F представляет L-фенилаланин, Q представляет L-глутамин, G представляет L-глицин, а P представляет L-пролин.

В некоторых вариантах осуществления $\text{RG}^1\text{DLXaa}^1\text{Xaa}^2\text{L}$ (SEQ ID NO: 117) выбирают из группы, состоящей из RGDLAAbuL (SEQ ID NO: 118), RGDLKAbuL (SEQ ID NO: 119), RGDLEAbuL (SEQ ID NO: 120), RGDLFAbuL (SEQ ID NO: 121), RGDLQAbuL (SEQ ID NO: 122), RGDLGAbuL (SEQ ID NO: 123), RGDLPAbuL (SEQ ID NO: 124), RGDLAKL (SEQ ID NO: 125), RGDLAEL (SEQ ID NO: 126), RGDLAFL (SEQ ID NO: 127), RGDLAQL (SEQ ID NO: 128), RGDLAGL (SEQ ID NO: 129) и RGDLAPL (SEQ ID NO: 130), причем

R представляет L-аргинин;

G представляет L-глицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (аспартат);

L представляет L-лейцин;

A представляет L-аланин;

Abu представляет L- α -аминомасляную кислоту;

K представляет L-лизин;

E представляет L-глутаминовую кислоту (глутамат);

F представляет L-фенилаланин;

Q представляет L-глутамин; а

P представляет L-пролин.

В некоторых вариантах осуществления G (L-глицин) в любой из предыдущих формул заменен Me-Gly (N-метилглицин).

В некоторых вариантах осуществления Xaa^3 или Xaa^4 представляет нестандартную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления Xaa^3 представляет нестандартную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления Xaa^4 представляет нестандартную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления как Xaa^3 , так и Xaa^4 представляют нестандартные аминокислоты.

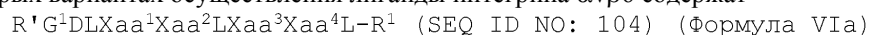
В некоторых вариантах осуществления Xaa^3 и/или Xaa^4 представляют Cit. В некоторых вариантах осуществления Xaa^3 представляет Cit. В некоторых вариантах осуществления Xaa^4 представляет Cit.

В некоторых вариантах осуществления Xaa^3 или Xaa^4 не имеют заряда. В некоторых вариантах осуществления Xaa^3 не имеет заряда. В некоторых вариантах осуществления Xaa^4 не имеет заряда. В некоторых вариантах осуществления Xaa^3 и Xaa^4 не имеют заряда.

В некоторых вариантах осуществления Xaa^3 не имеет заряда, а Xaa^4 представляет нестандартную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления Xaa^3 не имеет заряда, а Xaa^4 представляет нестандартную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления Xaa^3 представляет Aib. В некоторых вариантах осуществления Xaa^4 представляет Aib.

В некоторых вариантах осуществления Xaa^3Xaa^4 представляет CitAib, CitE, CitF, CitG, CitK, CitP, CitQ, EAib, FAib, KAib, PAib или QAib, причем Cit представляет цитруллин, Aib представляет аминокислоту (α -метилаланин), K представляет L-лизин, E представляет L-глутаминовую кислоту (глутамат), F представляет L-фенилаланин, Q представляет L-глутамин, G представляет L-глицин, а P представляет L-пролин.

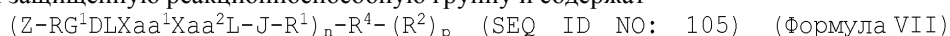
В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин $\alpha\text{v}\beta 6$ содержат



в которой R^1 представляет Dap(гуанидин); а

G^1 , D, L, Xaa^1 , Xaa^2 , Xaa^3 , Xaa^4 и R^1 каждый соответствует определению для формулы VI в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин $\alpha\text{v}\beta 6$ содержат реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу и содержат



в которой Z представляет аминотерминальный кэп (например, любой из аминотерминальных кэпов, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

Xaa¹ представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Xaa² представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

J является необязательным, а если имеется, содержит одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30) L-α аминокислот (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислот (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), или α,α-дизамещенных аминокислот (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), или их комбинацию;

R¹ является необязательным, а если имеется, содержит полиэтиленгликоль (PEG) и/или связывающую группу;

n представляет число больше 0 (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30);

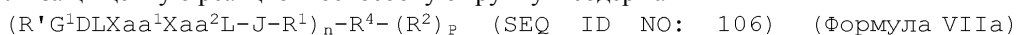
R⁴ является необязательным, а если имеется, содержит каркас и/или связывающую группу, которая содержит по меньшей мере одну точку присоединения для каждого лиганда и по меньшей мере одну точку присоединения для каждой карго-молекулы;

p представляет число больше 0 (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30); а

R² содержит реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу.

В некоторых вариантах осуществления L связан с J посредством амидной связи. В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6, которые содержат одну или более реакционноспособных групп или защищенных реакционноспособных групп, можно ввести в реакцию с карго-молекулой с образованием конъюгата лиганд интегрин αvβ6-карго-молекула.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6 содержат реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу и содержат

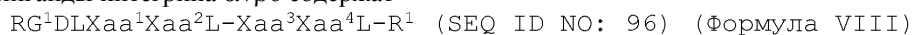


в которой R' представляет Дар(гуанидин); а

G¹, D, L, Xaa¹, Xaa², J, R¹, n, R⁴, p и R² каждый соответствует определению для формулы VII в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления L связан с J посредством амидной связи. Карго-молекулой может быть любая молекула, которую требуется нацелить на экспрессирующую интегрин αvβ6 клетку.

В некоторых вариантах осуществления, особенно когда требуется только локализованная доставка (например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью небулайзера, внутритрахеального, интраназального или с помощью местного введения), лиганды интегрин αvβ6 можно синтезировать без наличия аминотерминального кэпа при условии, что по меньшей мере одна или более аминокислот представляют нестандартные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6 содержат



в которой R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

Xaa¹ представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе

или известных в данной области);

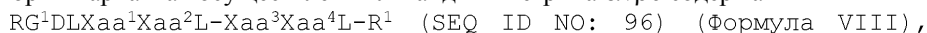
Хаа² представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Хаа³ представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

Хаа⁴ представляет L-α аминокислоту (например, любую из L-α аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области), L-β аминокислоту (например, любую из L-β аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области) или α,α-дизамещенную аминокислоту (например, любую из α,α-дизамещенных аминокислот, описанных в настоящем документе или известных в данной области);

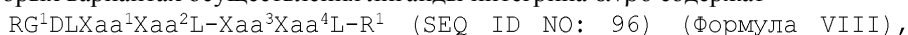
R¹ является необязательным, а если имеется, содержит PEG и/или связывающую группу; и по меньшей мере один из Хаа¹, Хаа², Хаа³ и Хаа⁴ представляет нестандартную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6 содержат



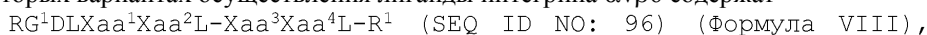
причем каждая переменная соответствует определению выше для формулы VIII, при этом по меньшей мере два из Хаа¹, Хаа², Хаа³ и Хаа⁴ представляют нестандартную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6 содержат



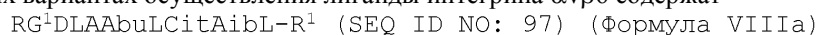
причем каждая переменная соответствует определению выше для формулы VIII, при этом по меньшей мере три из Хаа¹, Хаа², Хаа³ и Хаа⁴ представляют нестандартную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6 содержат



причем каждая переменная соответствует определению выше для формулы VIII, при этом Хаа², Хаа³ и Хаа⁴ представляют нестандартную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6 содержат



в которой R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

A представляет L-аланин;

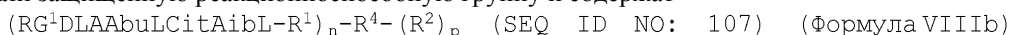
Abu представляет L-α-аминомасляную кислоту;

Cit представляет цитруллин;

Aib представляет α-аминоизомасляную кислоту; а

R¹ является необязательным, а если имеется, содержит PEG и/или связывающую группу.

В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрин αvβ6 содержат реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу и содержат



в которой R представляет L-аргинин;

G¹ представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

A представляет L-аланин;

Abu представляет L-α-аминомасляную кислоту;

Cit представляет цитруллин;

Aib представляет α-аминоизомасляную кислоту;

R¹ является необязательным, а если имеется, содержит PEG и/или связывающую группу; n представляет число больше 0 (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30);

R⁴ является необязательным, а если имеется, содержит каркас или связывающую группу, которая содержит по меньшей мере одну точку присоединения для каждого лиганда и по меньшей мере точку присоединения для каждой карго-молекулы;

p представляет число больше 0 (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30); а

R^2 содержит реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу.

В некоторых вариантах осуществления одна или более карго-молекул конъюгированы с одним или более лигандами интегрин $\alpha v \beta 6$ и содержат

$(RG^1DLAAbuLCitAibL-R^4)_n-R^4-(R^3)_p$ (SEQ ID NO: 108) (Формула VIIIC)

в которой R представляет L-аргинин;

G^1 представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспарат);

L представляет L-лейцин;

R^1 является необязательным, а если имеется, содержит PEG и/или связывающую группу;

n представляет число больше 0 (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30);

R^4 является необязательным, а если имеется, содержит каркас или связывающую группу, которая содержит по меньшей мере одну точку присоединения для каждого лиганда и по меньшей мере точку присоединения для каждой карго-молекулы;

p представляет число больше 0 (например, 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 или 30; или 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-30, 15-25, 15-20, 20-30, 20-25 или 25-30); а

R^3 содержит одну или более карго-молекул.

Одной или более карго-молекулами может быть любая молекула, которую требуется нацелить на экспрессирующую интегрин $\alpha v \beta 6$ клетку.

В рамках изобретения в некоторых вариантах осуществления R^1 имеется и содержит PEG группу, имеющую 1-100 единиц этиленоксида (CH_2-CH_2-O) (например, 1-90, 1-80, 1-70, 1-60, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-10, 1-5, 2-100, 2-90, 2-80, 2-70, 2-60, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-10, 2-5, 5-100, 5-90, 5-80, 5-70, 5-60, 5-50, 5-40, 5-30, 5-20, 5-10, 10-100, 10-90, 10-80, 10-70, 10-60, 10-50, 10-40, 10-30, 10-20, 20-100, 20-90, 20-80, 20-70, 20-60, 20-50, 20-40, 20-30, 30-100, 30-90, 30-80, 30-70, 30-60, 30-50, 30-40, 40-100, 40-90, 40-80, 40-70, 40-60, 40-50, 50-100, 50-90, 50-80, 50-70, 50-60, 60-100, 60-90, 60-80, 60-70, 70-100, 70-90, 70-80, 80-100, 80-90 или 90-100 единиц этиленоксида). В некоторых вариантах осуществления R^1 имеется и содержит PEG группу, имеющую 2-30 единиц этиленоксида. В некоторых вариантах осуществления R^1 имеется и содержит PEG группу, имеющую 2-20 единиц этиленоксида. В некоторых вариантах осуществления R^1 имеется и содержит PEG группу, имеющую 2-10 единиц этиленоксида. В некоторых вариантах осуществления R^1 имеется и содержит PEG группу, имеющую 5-20 единиц этиленоксида. В некоторых вариантах осуществления R^1 имеется и содержит PEG группу, имеющую 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 единиц этиленоксида.

Реакционноспособные группы хорошо известны в данной области и обеспечивают образование ковалентных связей между двумя молекулами или реагентами. Подходящие реакционноспособные группы для использования в рамках изобретения в настоящем описании включают без ограничения аминогруппы, амидогруппы, карбонокислотные группы, азиды, алкины, пропаргильные группы, BCN(бицикло[6,1,0]нонин, DBCO(дibenзоциклооктин)тиолы, малеимидные группы, аминоксигруппы, N-гидроксисукцинимид (NHS) или другой активированный сложный эфир (например, PNP, TFP, PFP), группы брома, альдегиды, карбонаты, тозилаты, тетразины, транс-циклооктен (TCO), гидразиды, гидроксильные группы, дисульфиды и ортопиридилдисульфидные группы.

Включение реакционноспособных групп может облегчить конъюгацию раскрытого в настоящем описании лиганда интегрин $\alpha v \beta 6$ с карго-молекулой. Реакции конъюгации хорошо известны в данной области и обеспечивают образование ковалентных связей между двумя молекулами или реагентами. Подходящие реакции конъюгации для использования в рамках изобретения в настоящем описании включают без ограничения реакцию сочетания амида, реакцию присоединения Михаэля, реакцию образования гидразона и реакцию циклоприсоединения в клик-химии.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем описании целенаправленно воздействующие лиганды интегрин $\alpha v \beta 6$ синтезируют в виде сложного тетрафторфенилового (TFP) эфира, который можно вытеснить реакционноспособной аминогруппой для присоединения карго-молекулы.

Защищенные реакционноспособные группы также широко используют в данной области. Защитная группа обеспечивает временное химическое преобразование реакционноспособной группы в группу, которая не вступает в реакцию в условиях, в которых незащищенная группа вступает в реакцию, например, для обеспечения хемоселективности последующей химической реакции. Подходящие защищенные реакционноспособные группы для использования в рамках изобретения в настоящем описании включают без ограничения BOC группы (t-бутоксикарбонил), Fmoc (9-фторенилметоксикарбонил), карбоксибензильные (CBZ) группы, бензильные сложные эфиры и PBF (2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил).

Карго-молекулой является любая молекула, для которой может быть необходимо целенаправленное

воздействие на интегрин $\alpha\nu\beta 6$ или экспрессирующую интегрин $\alpha\nu\beta 6$ клетку. Карго-молекулой может быть без ограничения фармацевтический ингредиент, лекарственное средство, пролекарство, имеющее терапевтическое значение вещество, малая молекула, антитело, фрагмент антитела, иммуноглобулин, моноклональное антитело, метка или маркер, липид, натуральная или модифицированная нуклеиновая кислота или полинуклеотид, пептид, полимер, полиамин, белок, аптамер, токсин, витамин, PEG, гаптен, дигоксигенин, биотин, радиоактивный атом или молекула, или флуорофор. В некоторых вариантах осуществления одна или более карго-молекул (например, одинаковые или разные карго-молекулы) связывают с одним или более лигандами интегрина $\alpha\nu\beta 6$ для целенаправленного воздействия карго-молекул на экспрессирующую интегрин $\alpha\nu\beta 6$ клетку.

В некоторых вариантах осуществления одной или более карго-молекулами является фармацевтический ингредиент или фармацевтическая композиция. В некоторых вариантах осуществления одной или более карго-молекулами является олигомерное соединение. В рамках изобретения "олигомерным соединением" является нуклеотидная последовательность, содержащая приблизительно 10-50 (например, 10-48, 10-46, 10-44, 10-42, 10-40, 10-38, 10-36, 10-34 10-32, 10-30, 10-28, 10-26, 10-24, 10-22, 10-20, 10-18, 10-16, 10-14, 10-12, 12-50, 12-48, 12-46, 12-44, 12-42, 12-40, 12-38, 12-36, 12-34, 12-32, 12-30, 12-28, 12-26, 12-24, 12-22, 12-20, 12-18, 12-16, 12-14, 14-50, 14-48, 14-46, 14-44, 14-40, 14-38, 14-36, 14-34, 14-32, 14-30, 14-28, 14-26, 14-24, 14-22, 14-20, 14-18, 14-16, 16-50, 16-48, 16-46, 16-44, 16-42, 16-40, 16-38, 16-36, 16-34, 16-32, 16-30, 16-28, 16-26, 16-24, 16-22, 16-20, 16-18, 18-50, 18-48, 18-46, 18-44, 18-42, 18-40, 18-38, 18-36, 18-34, 18-32, 18-30, 18-28, 18-26, 18-24 18-22, 18-20, 20-50, 20-48, 20-46, 20-44, 20-42, 20-40, 20-38, 20-36, 20-34 20-32, 20-30, 20-28, 20-26, 20-24, 20-22, 22-50, 22-48, 22-46, 22-44, 22-42, 22-40, 22-38, 22-36, 22-34, 22-32, 22-30, 22-28, 22-26, 22-24, 24-50, 24-48, 24-46, 24-44, 24-42, 24-40, 24-38, 24-36, 24-34, 24-32, 24-30, 24-28, 24-26, 26-50, 26-48, 26-46, 26-44, 26-42, 26-40, 26-38, 26-36, 26-34, 26-32, 26-30, 26-28, 28-50, 28-48, 28-46, 28-44, 28-42, 28-40, 28-38, 28-36, 28-34, 28-32, 28-30, 30-50, 30-48, 30-46, 30-44, 30-42, 30-40, 30-38, 30-36, 30-34, 30-32, 32-50, 32-48, 32-46, 32-44, 32-42, 32-40, 32-38, 32-36, 32-34, 34-50, 34-48, 34-46, 34-44, 34-42, 34-40, 34-38 34-36, 36-50, 36-48, 36-46, 36-44, 36-42, 36-40, 36-38, 38-50, 38-48, 38-46, 38-44, 38-42, 38-40, 40-50, 40-48 40-46, 40-44, 40-42, 42-50, 42-48, 42-46, 42-44, 44-50, 44-48, 44-46, 46-50, 46-48 или 48-50) нуклеотидов или пар нуклеиновых оснований. В некоторых вариантах осуществления олигомерное соединение имеет последовательность нуклеиновых оснований, которая по меньшей мере частично комплементарна кодирующей последовательности экспрессируемой целевой нуклеиновой кислоты или целевого гена внутри клетки. В некоторых вариантах осуществления олигомерные соединения, при доставке в клетку, экспрессирующую ген, способны ингибировать экспрессию лежащего в основе гена и в настоящем описании называются "ингибирующие экспрессию олигомерные соединения". Экспрессию гена можно ингибировать *in vitro* или *in vivo*.

"Олигомерные соединения" включают без ограничения олигонуклеотиды, одноцепочечные олигонуклеотиды, одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды, короткие интерферирующие РНК (siRNA), двухцепочечные РНК (dsRNA), микро РНК (miRNA), короткие шпилечные РНК (shRNA), рибозимы, молекулы интерферирующей РНК и субстраты дайсера. В некоторых вариантах осуществления олигомерным соединением является одноцепочечное олигомерное соединение. В некоторых вариантах осуществления олигомерным соединением является двухцепочечное олигомерное соединение.

В некоторых вариантах осуществления одной или более карго-молекулами является/являются "средство РНКи", которое согласно определению в настоящем описании представляет собой средство, которое содержит РНК или РНК-подобную (например, химически модифицированную РНК) молекулу олигонуклеотида, которая способна разрушать или ингибировать трансляцию транскриптов информационной РНК (мРНК) целевой мРНК специфическим для последовательности образом. В рамках изобретения средства РНКи могут действовать посредством механизма РНК-интерференции (т.е. индуцируя РНК-интерференцию через взаимодействие с аппаратом пути РНК-интерференции (индуцируемый РНК комплекс сайленсинга или RISC) клеток млекопитающих) или посредством любого альтернативного механизма (механизмов) или пути (путей). Хотя полагают, что средства РНКи, как этой термин используется в настоящем описании, действуют в основном через механизм РНК-интерференции, раскрытые средства РНКи не связаны или не ограничены каким-либо конкретным путем или механизмом действия. Средства РНКи включают без ограничения одноцепочечные олигонуклеотиды, одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды, короткие интерферирующие RNA (siRNA), двухцепочечные RNA (dsRNA), микро RNA (miRNA), короткие шпилечные РНК (shRNA) и субстраты дайсера.

Обычно средства РНКи могут состоять из по меньшей мере смысловой цепи (также называемой сопровождающая цепь), которая содержит первую последовательность, и антисмысловой цепи (также называемой направляющая цепь), которая содержит вторую последовательность. Величина каждой из смысловой и антисмысловой цепей средства РНКи может составлять 16-49 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи средства РНКи независимо составляют 17-26 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи независимо составляют 19-26 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи независимо составляют 21-26 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществ-

ствления смысловая и антисмысловая цепи независимо составляют 21-24 нуклеотидов в длину. Смысловая и антисмысловая цепи могут иметь либо одинаковую длину, либо разную длину. Средства РНКи содержат последовательность антисмысловой цепи, которая по меньшей мере частично комплементарна последовательности целевого гена, а при доставке в клетку, экспрессирующую мишень, средство РНКи может ингибировать экспрессию одного или более целевых генов *in vivo* или *in vitro*.

Олигомерные соединения в целом, и средства РНКи конкретно могут состоять из модифицированных нуклеотидов и/или одной или более связей не на основе сложного фосфодиэфира. В рамках изобретения "модифицированным нуклеотидом" является нуклеотид, не являющийся рибонуклеотидом (2'-гидроксильным нуклеотидом). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99 или 100%) нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами. В рамках изобретения модифицированный нуклеотид включает без ограничения деоксирибонуклеотиды, имитаторы нуклеотидов, нуклеотиды с удаленным азотистым основанием, 2'-модифицированные нуклеотиды, (инвертированные) нуклеотиды 3'-3' связей, ненатуральные содержащие основания нуклеотиды, мостиковые нуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты, 2',3'-секо имитаторы нуклеотидов (незапертые аналоги нуклеиновых оснований, запертые нуклеотиды, нуклеотиды с 3'-О-метокси (2' интернуклеозидными связями), 2'-F-арабино нуклеотиды, 5'-Me, 2'-фтор нуклеотид, морфолино нуклеотиды, винил фосфонат деоксирибонуклеотиды, содержащие винилфосфонат нуклеотиды и содержащие циклопропилфосфонат нуклеотиды. 2'-модифицированные нуклеотиды (т.е. нуклеотид с группой, не являющейся гидроксильной группой, в 2' позиции пятичленного кольца Сахаров) включают без ограничения 2'-О-метил нуклеотиды, 2'-деокси-2'-фтор нуклеотиды, 2'-деокси нуклеотиды, 2'-метоксиэтил (2'-О-2-метоксиэтил) нуклеотиды, 2'-амино нуклеотиды и 2'-алкил нуклеотиды.

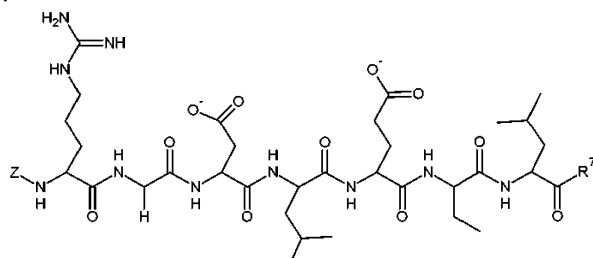
Кроме того, один или более нуклеотидов олигомерного соединения, такого как средство РНКи, могут быть связаны нестандартными связями или остовами (т.е. модифицированными интернуклеозидными связями или модифицированными остовами). Модифицированной интернуклеозидной связью может быть не содержащая фосфат ковалентная интернуклеозидная связь. Модифицированные интернуклеозидные связи или остовы включают без ограничения 5'-фосфоротиоатные группы, хиральные фосфотиоаты, тиофосфаты, фосфородитиоаты, фосфотрисложные эфиры, аминоксилфосфотрисложные эфиры, алкилфосфонаты (например, метилфосфонаты или 3'-алкиленфосфонаты), хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты (например, 3'-аминофосфорамидат, аминоксилфосфорамидаты или тионофосфорамидаты), тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотрисложные эфиры, морфолиновые связи, боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5' связи, 2'-5' связанные аналоги боранофосфатов, или боранофосфаты, имеющие обратную ориентацию, при которой соседние пары нуклеозидных единиц связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'.

Необязательно, чтобы все позиции в данном соединении были однородно модифицированы. Наоборот, в одном олигомерном соединении или даже в одном его нуклеотиде может быть заключена более чем одна модификация.

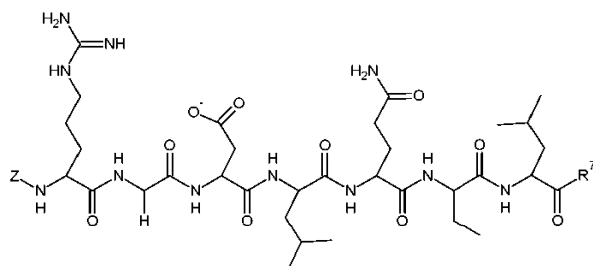
Смысловые цепи и антисмысловые цепи средства РНКи можно синтезировать и/или модифицировать способами, известными в данной области. Например, раскрытие средств РНКи, направленных на ингибирование экспрессии альфа-ENaC, можно найти, например, в публикации международной патентной заявки № WO 2008/152131, которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки. Можно найти дополнительные раскрытия, относящиеся к средствам РНКи, например, можно найти в раскрытии модификаций, например, в международной патентной заявке № PCT/US2017/0455446 Arrowhead Pharmaceuticals, Inc. Которая также полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления одна или более карго-молекула (молекулы) могут содержать или состоять из фрагмента PEG, который может выступать в качестве фармакокинетического (ФК) модулятора. В некоторых вариантах осуществления одна или более карго-молекул могут содержать фрагмент PEG, имеющий приблизительно 20-900 единиц этиленоксида ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$) (например, 20-850, 20-800, 20-750, 20-700, 20-650, 20-600, 20-550, 20-500, 20-450, 20-400, 20-350, 20-300, 20-250, 20-200, 20-150, 20-100, 20-75, 20-50, 100-850, 100-800, 100-750, 100-700, 100-650, 100-600, 100-550, 100-500, 100-450, 100-400, 100-350, 100-300, 100-250, 100-200, 100-150, 200-850, 200-800, 200-750, 200-700, 200-650, 200-600, 200-550, 200-500, 200-450, 200-400, 200-350, 200-300, 200-250, 250-900, 250-850, 250-800, 250-750, 250-700, 250-650, 250-600, 250-550, 250-500, 250-450, 250-400, 250-350, 250-300, 300-900, 300-850, 300-800, 300-750, 300-700, 300-650, 300-600, 300-550, 300-500, 300-450, 300-400, 300-350, 350-900, 350-850, 350-800, 350-750, 350-700, 350-650, 350-600, 350-550, 350-500, 350-450, 350-400, 400-900, 400-850, 400-800, 400-750, 400-700, 400-650, 400-600, 400-550, 400-500, 400-450, 450-900, 450-850, 450-800, 450-750, 450-700, 450-650, 450-600, 450-550, 450-500, 500-900, 500-850, 500-800, 500-750, 500-700, 500-650, 500-600, 500-550, 550-900, 550-850, 550-800, 550-750, 550-700, 550-650, 550-600, 600-900, 600-850, 600-800, 600-750, 600-700, 600-650, 650-900, 650-850, 650-800, 650-750, 650-700, 700-900, 700-850, 700-800, 700-750, 750-900, 750-850, 750-800, 800-900, 850-900 или

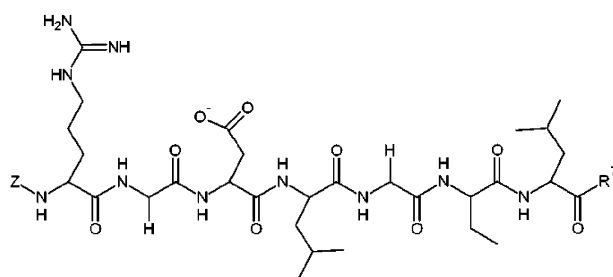
В некоторых вариантах осуществления лиганды интегрина $\alpha\text{v}\beta 6$ содержат следующие структуры, в которых Z и R¹ соответствуют определению для формулы III и формулы IV в настоящем описании, а R⁷ может быть OH, J, J-R¹, J-R¹-R² или Y-R¹-R³ (как каждый из них определен для формулы III и формулы IV в настоящем описании):



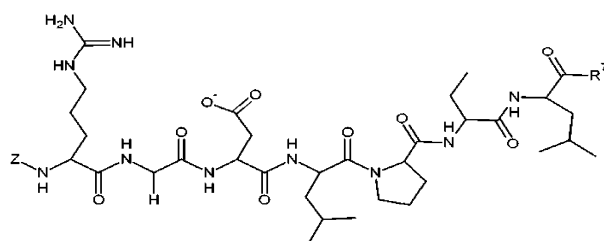
(SEQ ID NO: 110) (Формула X)



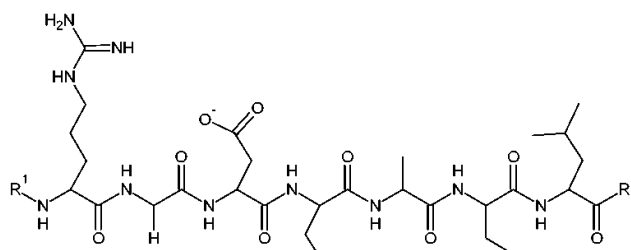
(SEQ ID NO: 111) (Формула XI)



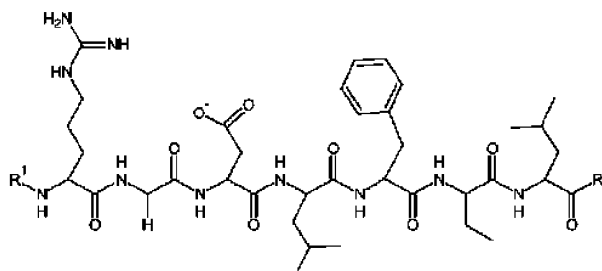
(SEQ ID NO: 112) (Формула XII)



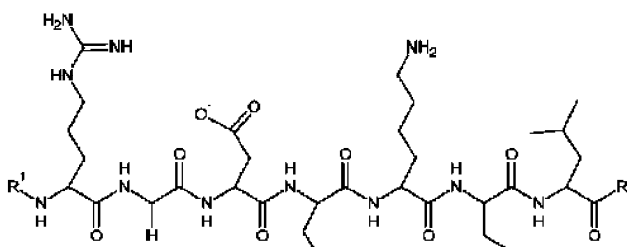
(SEQ ID NO: 113) (Формула XIII)



(SEQ ID NO: 114) (Формула XIV)



(SEQ ID NO: 115) (Формула XV)



(SEQ ID NO: 116) (Формула XVI)

В некоторых вариантах осуществления описанные лиганды $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ демонстрировали повышенную стабильность в сыворотке по сравнению с существующим в природе связывающим интегрин $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ пептидом RGDLATLRQL (SEQ ID NO: 1). Как показано в примерах в настоящем описании, только приблизительно 5% существующего в природе пептида RGDLATLRQL (SEQ ID NO: 1) можно обнаружить после инкубации 4 ч при 37°C в мышиной плазме. Пептид RGDLATLRQL (SEQ ID NO: 1) нельзя было обнаружить спустя 8 ч при 37°C в мышиной плазме. В некоторых вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании лиганд интегрин $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ демонстрирует более чем 20% оставшегося лиганда, определяемого посредством HPLC после 12-часовой инкубации при 37°C в мышиной плазме. Наряду с наличием повышенной стабильности в сыворотке от натурального пептида описанные лиганды интегрин $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ сохраняли связывание с интегрином $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ (аффинность к нему).

Фармацевтические композиции

В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии предоставлены фармацевтические композиции, которые содержат или состоят из или по существу состоят из одного или более раскрытых в настоящем описании лигандов интегрин $\alpha\text{v}\beta\text{6}$.

В рамках изобретения "фармацевтическая композиция" содержит фармакологически эффективное количество Активного Фармацевтического Ингредиента (API) и необязательно одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. Фармацевтически приемлемое вспомогательное средство (вспомогательные средства) представляют собой вещества, отличающиеся от активного фармацевтического ингредиента (API, терапевтического продукта), которые специально содержатся в системе доставки лекарственных средств. Вспомогательные средства не оказывают или не предназначены оказывать терапевтическое действие в намеченной дозировке. Вспомогательные средства могут действовать для

- помощи в обработке системы доставки лекарственных средств во время получения;
- защиты, поддержки или повышения стабильности, биодоступности или приемлемости для пациента API;
- содействия идентификации продукта; и/или
- повышения любого другого признака общей безопасности, эффективности, доставки API во время хранения или применения.

Фармацевтически приемлемое вспомогательное средство может быть инертным или не инертным веществом.

Вспомогательные средства включают без ограничения усилители абсорбции, антиадгезивы, проти-

вспенивающие средства, антиоксиданты, связующие вещества, буферные средства, носители, покрывающие средства, красители, улучшители доставки, полимеры для доставки, декстран, декстозу, разбавители, разрыхлители, эмульгаторы, сухие разбавители, наполнители, ароматизаторы, скользящие вещества, увлажнители, смазывающие вещества, масла, полимеры, консерванты, солевой раствор, соли, растворители, сахара, суспендирующие вещества, матрицы с замедленным высвобождением, подсластители, загущающие средства, регуляторы тоничности, несущие среды, водоотталкивающие средства и смачивающие средства.

Описанные в настоящем документе фармацевтические композиции могут содержать другие дополнительные компоненты, часто встречающиеся в фармацевтических композициях. В некоторых вариантах осуществления дополнительным компонентом является фармацевтически-активный материал. Фармацевтически-активные материалы включают без ограничения противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства (например, антигистамин, дифенгидрамин и т.д.), низкомолекулярное лекарственное средство, антитело, фрагмент антитела, аптамеры и/или вакцину.

Фармацевтические композиции также могут содержать консервирующие средства, солубилизирующие средства, стабилизирующие средства, смачивающие средства, эмульгаторы, подсластители, красители, пахучие вещества, соли для изменения осмотического давления, буферы, покрывающие средства или антиоксиданты. Они также могут содержать другие терапевтически значимые средства.

Фармацевтические композиции можно вводить многими способами в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение и от области, подлежащей лечению. Вводить можно любым способом, широко известным в данной области, например без ограничения местным (например, посредством трансдермального пластыря), пульмональным (например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью небулайзера, внутритрахеального, интраназального), эпидермальным, трансдермальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает без ограничения внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутривнутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; подкожное (например, посредством имплантированного устройства), внутривнутричрепное, интрапаренхиматозное, интратекальное и интравентрикулярное введение. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны фармацевтические композиции, вводимые посредством подкожной инъекции. Фармацевтические композиции можно вводить перорально, например, в виде таблеток, таблеток с покрытием, драже, твердых или мягких желатиновых капсул, растворов, эмульсий или суспензий. Введение также можно выполнять ректально, например, используя суппозитории; местно или чрескожно, например, используя мази, крема, гели или растворы; или парентерально, например, используя растворы для инъекций.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в виде инъекций, содержат стерильные водные растворы (когда растворимы в воде) или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального препарата стерильных инъектируемых растворов или дисперсии. Для внутривенного введения подходящие носители содержат физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Кремофор ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатный буферный солевой раствор. Он должен быть стабильным в условиях получения и хранения и должен содержать консерванты против заражающего действия микроорганизмов, например бактерий и грибов. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно сохранять, например, за счет применения покрытия, например, лецитина, за счет сохранения требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительно содержание в композиции изотонических средств, например сахаров, полиспиртов, например, маннитола, сорбитола и натрия хлорида. Пролонгированное поглощение инъектируемых композиций может быть обусловлено содержанием в композиции средства, которое задерживает поглощение, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъектируемые растворы можно получать посредством включения в надлежащий растворитель при необходимости активного соединения в требуемом количестве с одним или комбинацией перечисленных выше ингредиентов с последующей стерилизацией фильтрованием. В целом, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильную несущую среду, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций способы получения включают вакуумную сушку и лиофильную сушку, что дает порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из его ранее простерилизованного фильтрованием раствора.

Готовые формы, подходящие для внутрисуставного введения, могут быть в виде стерильного водного препарата любого из описанных в настоящем документе лигандов, которые могут быть в микрокристаллической форме, например, в виде водной микрокристаллической суспензии. Липосомные готовые формы или биоразлагаемые полимерные системы также можно использовать для предоставления любого из описанных в настоящем документе лигандов как для внутрисуставного, так и для офтальмологического введения.

Активные соединения можно получать с носителями, которые будут защищать соединение от бы-

строого удаления из организма, например готовой формой для регулируемого освобождения, содержащей имплантаты и микрокапсульные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, например этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортосложные эфиры и полимолочную кислоту. Специалистам в данной области будут очевидны способы получения подобных готовых форм. В качестве фармацевтически приемлемых носителей также можно использовать липосомные суспензии. Их можно получать согласно способам, известным специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4522811.

Фармацевтическая композиция может содержать другие дополнительные компоненты, часто встречающиеся в фармацевтических композициях. Подобные дополнительные компоненты включают без ограничения противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства (например, антигистамин, дифенгидрамин и т.д.). В рамках изобретения "фармакологически эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" или просто "эффективное количество" относится к эффективному количеству фармацевтически активного средства для получения фармакологического, терапевтического или профилактического результата.

Содержащего лиганд $\alpha\upsilon\beta 6$ лекарственные препараты также являются целью настоящего изобретения, также как способы получения подобных лекарственных препаратов, причем способы включают доставку одного или более содержащих лиганд $\alpha\upsilon\beta 6$ соединений, при необходимости одного или более других имеющих терапевтическое значение веществ, в лекарственной форме, подходящей для введения пациентам-людям.

Клетки, ткани и нечеловеческие организмы.

Предусмотрены клетки, ткани и нечеловеческие организмы, которые содержат по меньшей мере один из описанных в настоящем описании лигандов $\alpha\upsilon\beta 6$. Клетку, ткань или нечеловеческий организм получают посредством доставки лиганда $\alpha\upsilon\beta 6$ в клетку, ткань или нечеловеческий организм с помощью любого доступного в данной области средства. В некоторых вариантах осуществления клеткой является клетка млекопитающего, включая без ограничения клетку человека.

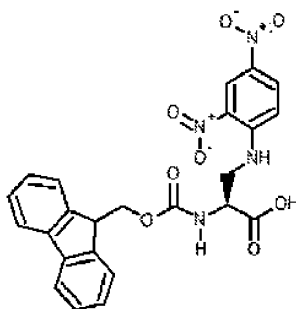
Описанные лиганды $\alpha\upsilon\beta 6$ и содержащие лиганды $\alpha\upsilon\beta 6$ фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем описании, могут быть упакованы или содержаться в наборе, контейнере, пакете или распылителе. Лиганды $\alpha\upsilon\beta 6$ и содержащие лиганды $\alpha\upsilon\beta 6$ фармацевтические композиции можно упаковать в предварительно заполненные шприцы или флаконы.

Предоставленные выше варианты осуществления и пункты далее проиллюстрированы с помощью следующих, неограничивающих примеров.

Примеры

Пример 1. Синтез лигандов $\alpha\upsilon\beta 6$ для исследований стабильности в сыворотке.

Амидную смолу Ринка Chem-Matrix поместили в пористый полипропиленовый шприц и взбалтывали в DCM в течение 30 мин перед использованием. Использовали следующие стандартные условия твердофазного синтеза пептидов. Удаление защиты Fmoc проводили посредством впитывания 40 мл раствора пиперидин:DMF (20:80 о/о) на 1 ммоль смолы в течение 20 мин. Связывание амида проводили посредством впитывания смолы с 4 молярными эквивалентами Fmoc-аминокислоты, 4 молярными эквивалентами HBTU и 10 молярными эквивалентами диизопропилэтиламина в DMF в концентрации 0,1 М Fmoc-аминокислоты в DMF в течение 40 мин. Для соединения хромофора DNP со смолой использовали Fmoc-Dap(DNP)-ОН и синтезировали пептид из Dap α -амина. Расщепление смолы осуществляли в растворе трифторуксусной кислоты в течение 2 ч. Растворитель восстанавливали до 10% первоначального объема посредством нахождения под давлением воздуха и осаждали, используя Et₂O. Микрорасщепление посредством TFA и аналитической HPLC-MS подтвердило идентичность продукта. Затем пептиды очищали до чистоты >95% на препаративной HPLC Shimadzu, используя элюирование в широкопористой колонке C18 Supelco "Discovery BIO" (25 см×21 мм, частицы 10 мкм) с линейными градиентами приблизительно 1 мл/мин. Чистоту оценивали, используя аналитическую HPLC Shimadzu, оборудованную колонкой Waters XBridge BEH130 C18 (250×6,6 мм, частицы 5 пм), с использованием 10-90% растворителя В в течение 50 мин. Растворитель А обозначает H₂O:F₃CCO₂H 100:0,1 о/о, растворитель В обозначает CH₃CN:F₃CCO₂H 100:0,1 о/о.



Fmoc-Dap (DNP) -OH

Пример 2. Стабильность в сыворотке лигандов $\alpha\nu\beta 6$.

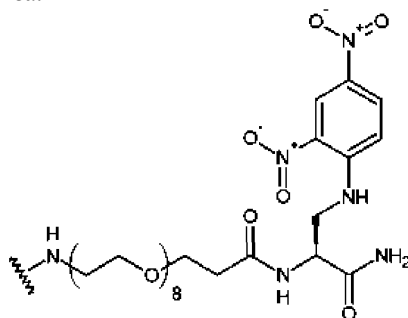
Стабильность в сыворотке лигандов $\alpha\nu\beta 6$ тестировали посредством инкубирования лигандов $\alpha\nu\beta 6$ в мышиной сыворотке и анализа процентного значения нерасщепленного пептида в разные моменты времени. Нерасщепленный лиганд $\alpha\nu\beta 6$ определяли посредством аналитической HPLC. Отдельные маточные растворы лигандов $\alpha\nu\beta 6$ получали путем растворения пептидов в H_2O при концентрации >10 мг/мл. Концентрацию лиганда $\alpha\nu\beta 6$ оценивали, используя поглощение UV/Vis (DNP: $\gamma=365$, $\varepsilon=17300$ $M^{-1}cm^{-1}$). Лиганд $\alpha\nu\beta 6$ разбавляли до 1 мг/мл лиганда в 90% мышиной плазме и помещали в инкубаторе при $37^\circ C$. В заданные моменты времени (4, 8, 12 и 24 ч) образец инжестировали в аналитическую HPLC (Shimadzu HPLC), оборудованную колонкой Waters XBridge BEH130 C18 (250×6,6 мм, частицы 5 мкм), используя 10-90% растворитель В в течение 50 мин. Растворитель А обозначает $H_2O:F_3CCO_2H$ 100:0,1 о/о, растворитель В обозначает $CH_3CN:F_3CCO_2H$ 100:0,1 о/о.

Процентное значение оставшегося лиганда после инкубации сыворотки рассчитывали, используя следующее уравнение:

$$\text{Оставшийся } \% = [(\text{Площадь при } t=x) + (\text{Площадь при } t=0)] \times 100\%$$

где Площадь при $t=0$ была площадь под пиком лиганда сразу после разбавления лиганда в плазме, а Площадь при $t=x$ была площадь под пиком пептида во время x .

Каждый пептид ковалентно связывали с карго-молекулой $PEG_8\text{-Dap(DNP)}$. Затем $PEG_8\text{-Dap(DNP)}$ использовали для облегчения анализа.



Производные пептида связывали с карго-молекулой $PEG_8\text{-Dap(DNP)}$ и инкубировали в мышиной сыворотке при $37^\circ C$ в течение 4, 8, 12 или 24 ч. Стабильность производных пептида измеряли посредством HPLC. Данные показаны в следующей табл. 1 (аминотерминальный кэп и Хаа¹Хаа² подчеркнуты).

Таблица 1

Стабильность в сыворотке лигандов $\alpha\upsilon\beta 6$

Производное Пептида	SEQ ID NO.	Оставшийся %			
		t=4 ч	t=8 ч	t=12 ч	t=24 ч
RGDLATLRQL	1	5	<0,1	<0,1	
Ac-RGDLATLTQL	2	90	67	34	
RGDLAAbuLCitAibL	3	48	16	5	
Ac-RGDLAAbuLCitAibL	4	94	82	72	
Ac-RGDLAAbuLCitAibL	4	86	75	67	41
Ac-RGDLAAbuLCitAib	5	95	82	73	48
Ac-RGDLAAbuLCit	6	88	77	69	44
Ac-RGDLAAbuL	7	91	85	80	69
Ac-RGDLAAbuLCitAib	5			72	
Ac-RGDLAAbuLCitK	8			35	
Ac-RGDLAAbuLCitE	9			79	
Ac-RGDLAAbuLCitF	10			22	
Ac-RGDLAAbuLCitQ	11	нерастворимый			
Ac-RGDLAAbuLCitG	12			49	
Ac-RGDLAAbuLCitAib	5			72	
Ac-RGDLAAbuLKAib	13			35	
Ac-RGDLAAbuLEAib	14			79	
Ac-RGDLAAbuLFAib	15			22	
Ac-RGDLAAbuLQAib	16	нерастворимый			
Ac-RGDLAAbuLGAib	17			49	
Ac-RGDLAAbuLCitAib	5			52	
CfRCfECO-RGDLAAbuLCitAib	18			49	
CFEtCFbECO-RGDLAAbuLCitAib	19			49	
CFEtCFbECO-RGDLAAbuLCitAib	20			58	
CFEfCFbECO-RGDLAAbuLCitAib	21			51	
Ac-RGDLAAbuLCitAib	5			87	
Ac-RGDLKAAbuLCitAib	22			71	
Ac-RGDLEAAbuLCitAib	23			98	
Ac-RGDLFAAbuLCitAib	24			64	
Ac-RGDLOAAbuLCitAib	25			87	
Ac-RGDLAAbuLCitAib	5			85	
Ac-RGDLPAAbuLCitAib	26			91	
Ac-RGDLAKLCitAib	27			72	
Ac-RGDLAELCitAib	28			96	
Ac-RGDLAFLCitAib	29			88	
Ac-RGDLAAbuLCitAib	5			72	
Ac-RGDLGAAbuLCitAib	30			82	
Ac-RGDLAGLCitAib	31			92	
Ac-RGDLAPLCitAib	32			84	
Ac-RGDLAAbuLCitP	33			68	
Ac-RGDLAAbuLCit	6			79	

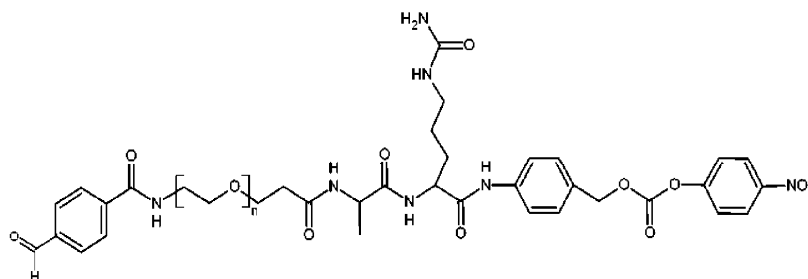
Как показано в настоящем описании, наличие аминотерминального кэпа (Z) может обеспечивать повышенную стабильность в сыворотке. Кроме того, как показано в настоящем описании, наличие нестандартных аминокислот в Хаа¹, Хаа² и/или J (например, Хаа³ и Хаа⁴) в раскрытых в настоящем описании формулах, также обеспечивают повышенную стабильность в сыворотке по сравнению с натуральным пептидом SEQ ID NO: 1.

Пример 3. Связывание интегрин лигандов $\alpha\upsilon\beta 6$.

А. Конъюгация лиганд $\alpha\upsilon\beta 6$ -карго-молекула.

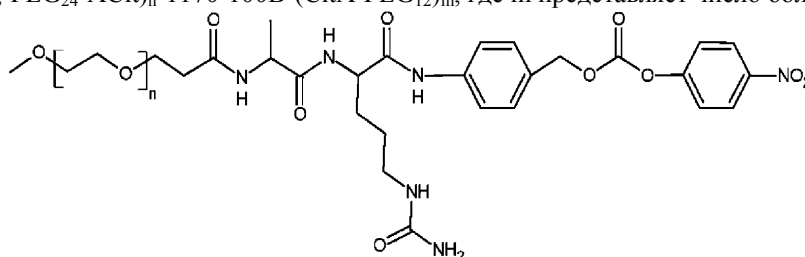
Каждый лиганд $\alpha\upsilon\beta 6$ соединяли с обратимо модифицированной полимерной карго-молекулой 1170-100В. Полимерную карго-молекулу 1170-100В (сополимер этоксиэтиламинакрилат:пропилакрилат 56:44, имеющую MW приблизительно 45000) метили Су5 (линкер NHS) и соединяли с альдегид-PEG₂₄-ACit при массовом отношении 2:1 (полимер:альдегид-PEG₂₄-ACit) в 50 мМ буфера HEPES pH 9,0 в течение

ние 1 ч при RT с образованием (альдегид-PEG₂₄-ACit)_n-1170-100B, где n представляет число больше 0. Обычно, n был приблизительно 10.



альдегид-PEG₂₄-ACit (n=24)

Затем альдегид-PEG₂₄-ACит-модифицированный полимер вводили в реакцию с PEG₁₂-ACit в массовом отношении 1:8 (полимер: PEG₁₂-ACit) в 50 мМ буфера HEPES, pH 9,0 в течение 1 ч при RT с образованием (альдегид-PEG₂₄-ACit)_n-1170-100B-(CitA-PEG₁₂)_m, где m представляет число больше 0.



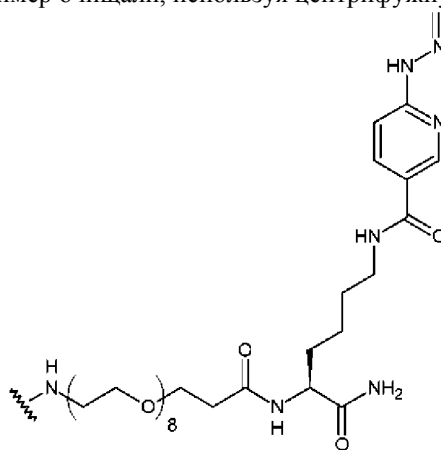
PEG₁₂-ACit (n=11)

Затем модифицированный полимер очищали, используя центрифужную колонку sephadex G-50, и определяли концентрацию

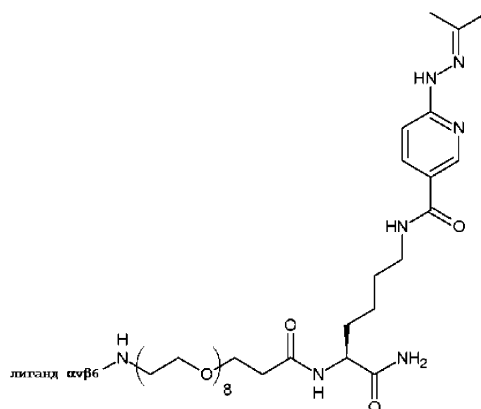
$$\text{полимер} \left(\frac{\text{мг}}{\text{мл}} \right) = \frac{\text{флуоресценция конь. Су5 после очистки}}{\text{флуоресценция конь. Су5 перед очисткой}} \times \frac{\text{мг}}{\text{мл}} \text{ конь. перед очисткой}$$

Каждый лиганд αvβ6 модифицировали HyNic для облегчения конъюгации с карго-молекулой. Очищенный полимер соединяли с лигандом αvβ6-(PEG)₈-K-HyNic при массовом отношении 1:1,9 (полимер:лиганд αvβ6) в 50 мМ буфера NaOAc-HOAc, pH 5,0 при RT в течение ночи с образованием конъюгата лиганд αvβ6-полимер.

Конъюгат лиганд αvβ6-полимер очищали, используя центрифужную колонку sephadex G-50.



(PEG)₈-K-HyNic

Лиганд $\alpha v\beta 6$ -(PEG)₈-K-HyNic

Эффективность конъюгации количественно оценивали посредством измерения поглощающей способности конъюгата $\alpha v\beta 6$ -полимер при 354 нм, используя коэффициент затухания, равный $2,9 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для бис-арилгидразоновой связи.

Молярная концентрация полимера (мМ)

$$= \frac{\text{массовая концентрация полимера (мг/мл)}}{\text{молекулярная масса полимера (Дальтон)}} \times 1000$$

Молярная концентрация $\alpha v\beta 6$ (мМ)

$$= \frac{[A_{354}(\text{конъюг.} - \alpha v\beta 6) - A_{354}(\text{контрольный конъюг. без } \alpha v\beta 6)]}{29}$$

$$\text{Количество } \alpha v\beta 6 \text{ на полимер} = \frac{\text{молярная концентрация } \alpha v\beta 6 \text{ (мМ)}}{\text{молярная концентрация полимера (мМ)}}$$

Для дальнейшего анализа конъюгаты $\alpha v\beta 6$ -полимер разбавляли изотоническим раствором глюкозы до требуемых концентраций.

В. Связывание лиганда $\alpha v\beta 6$ (проточно-цитометрический анализ).

Для оценки специфичности связывания лигандов $\alpha v\beta 6$ с интегрином $\alpha v\beta 6$ каждый лиганд $\alpha v\beta 6$ или пептид отрицательного контроля конъюгировали с меченым Cy5 полимером (как описано выше) и оценивали на связывание с клетками. Определили, что клетки HUH7 (гепатоцеллюлярной карциномы человека) и SKOV3 (карциномы яичников человека) демонстрируют очень низкую экспрессию $\alpha v\beta 6$ клеточной поверхностью, и их использовали в качестве клеточных линий отрицательного контроля. Клетки H2009 (эпителиальной аденокарциномы легкого человека) и CAPAN-2 (аденокарциномы поджелудочной железы человека) служили в качестве клеточных линий положительного контроля $\alpha v\beta 6$. Клетки отделяли от колб для культивирования с помощью аккутазы, промывали в PBS и сеяли в 5 мл полистироловые пробирки с круглым дном по 200,000 клеток в 200 мкл полной среды (среда для культивирования с добавками и эмбриональной телячьей сывороткой). Конъюгаты лиганд $\alpha v\beta 6$ -полимер или конъюгаты полимера без лиганда добавляли по 5 пг/мл (концентрация полимер-Cy5) в клетки, перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Инкубация при 37°C облегчала взаимодействие лиганд/рецептор, которое может приводить к статическому связыванию с внеклеточной поверхностью клеток и/или интернализированным комплексам лиганд/рецептор. Смесь ресуспендировали с интервалами 1 ч. После 3 ч инкубации клетки промывали 2×4 мл охлажденного буфера (PBS-2% FCS) и ресуспендировали в 200 мкл буфера, содержащего 10 мкМ синего красителя SYTOX для селекции живых/мертвых клеток. Образцы анализировали на цитометре Canto II BD Biosciences, оборудованном фиолетовым (405 нм), синим (488 нм) и красным (633 нм) лазерами.

Сперва жизнеспособные клетки селектировали в виде отрицательной по синему SYTOX популяции на С детекторе с фиолетовым лазером. Затем эти жизнеспособные клетки оценивали на связывание/поглощение конъюгата с красным лазером в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI) флуорофора Cy5. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo v10.1. Конкретный коэффициент MFI (sMFIr) для каждого лиганда $\alpha v\beta 6$ определяли по следующей формуле:

$$\text{значение MFI для конкретного образца/значение MFI без лиганда.}$$

Как показано в табл. 2 ниже, только пептид Ac-RGDLAc-LCitAibL демонстрировал умеренное связывание с клетками SKOV3. Этот пептид не показывал значительного связывания с клетками HUH7. Таким образом, ни один из тестируемых пептидов не показал неспецифическое связывание. Пептиды отрицательного контроля AcRGaMeDLAc-LCitAib, AcRGDaMeLAc-LCitAib, RGELATLRQL, AcCitGDLATLCitQL, AcK(Me)₂GDLATLRQL и AcR(Me)₂GDLATLRQL, которые не содержат RGD, не показали значительное связывание с клетками положительного контроля интегрин $\alpha v\beta 6$, H2009 или CAPAN-2, показывая от-

сутствие аффинности к интегрину $\alpha\beta 6$. Большая часть других пептидов демонстрировала связывание с клетками H2009 или CAPAN-2, которое было сопоставимо или выше чем у натуральных пептидов, RGDLATLRQL и RGDLATL, показывая хорошую аффинность к интегрину $\alpha\beta 6$.

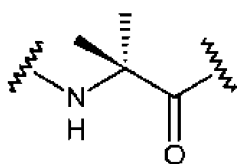
Таблица 2

Связывание лиганда $\alpha\beta 6$ с экспрессирующими (H2009 и CAPAN-2) и неэкспрессирующими (HUN7 и SKOV3) интегрин $\alpha\beta 6$ клетками

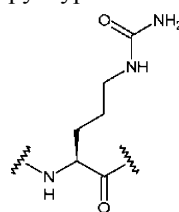
Пептид	SEQ ID NO	MFI			
		HUN7	SKOV3	H2009	CAPAN-2
Ac-RGDLAc-LCitAibL	4	1,0		3,2	7,7
Ac-RGaMeDLAc-LCitAib	34	0,9		0,9	1,0
Ac-RGDaMeLAc-LCitAib	35	0,9		0,8	0,9
Ac-RGDLAc-L	7	0,9		2,6	7,9
Ac-RGDLAc-LAib	36	0,9		3,2	8,9
RGDLATLRQL	1		1,4	4,7	
RGELATLRQL (RGE контроль)	37			0,99	
RGDLATLRQLEEEK- (HyNic)	38			6,5	
meta-гуанидин-бензоic-GDLATLRQL	39			4,5	
Ac-RGDLATLRQL	2			4,7	
Me-RGDLATLRQL	40			4,8	
Гуанидинил-RGDLATLRQL	41			4,3	
MeO-PEG8-RGDLATLRQL	42			2,5	
Ac-RGDLALLRQL	43			6,06	
Ac-RGDLAc-LRQL	44			6,47	
Ac-RGDLAILRQL	45			6,22	
Ac-RGDLAVLRQL	46			6,23	
Ac-CitGDLATLRQL	47			2,45	
Ac-RGDLATLCitQL	48			3,94	
Ac-CitGDLATLCitQL	49			0,99	
Ac-RGDLATLRAbuL	50			4,26	
Ac-RGDLATLRAibL	51			3,9	
Ac-RGDLATLRDap (Ac) L	52			4,18	
Ac-RGDLATLRCitL	53			4,07	
Ac-RGDLATLRNvaL	54			4,26	
RGDLATLRQL	55			4,32	
Ac-RGDLAc-LCitAibL	4		2,25	4,55	
Ac-K(Me) ₂ GDLATLRQL	56		0,9	1,1	
Ac-R(Me) ₂ GDLATLRQL	57		0,9	1	
Dap (гуанидин)-GDLATLRQL	58		1,4	3,4	
дезамино-RGDLATLRQL	59		0,8	1,1	
Ac-RGDL(33-hATLRQL	60		1,2	4,5	
Ac-RGDLAibTLRQL	61		1,4	4	
Ac-RGDLChaTLRQL	62		1	5,1	
RGDLATLRQ	63		1,6	4,7	
RGDLATLR	64		1,4	4,6	
RGDLATL	65		1,2	2,9	
RGDLAT	66		0,9	1,3	
Ac-RGDLAibAbuLCitAib	67				
Ac-RGDL(33-hAc-LCitAib	68			2,34	
Ac-RGDLChAc-LCitAib	69			1,6	
Ac-RNMeGDLATLRQL	70		0,97	4,61	
Ac-RGDLAc-LCitAib	5			4,7	
Ac-RNMeGDLAc-LCitAib	71			2,6	
Ac-RGDNMeLAc-LCitAib	72			1	
Ac-RGDLAc-N _{Me} LCitAib	73			1,3	
CH ₃ CH ₂ -RGDL Ac-LCit Aib	74			4,4	

CH ₃ (CH ₂) ₂ -RGDLAc-LCitAib	75			3, 9	
CH ₃ (CH ₂) ₃ -RGDLAc-LCitAib	76			4, 7	
CH ₃ (CH ₂) ₄ -RGDLAc-LCitAib	77			4, 1	
Ac-RGaMeDLAc-LCitAib	34			1	
Ac-RGDaMeLAc-LCitAib	35			1	
Ac-RGDLKAbuLCitAib	22			3, 6	
Ac-RGDLEAbuLCitAib	23			2, 6	
Ac-RGDLFAbuLCitAib	24			2, 7	
Ac-RGDLQAbuLCitAib	25			3, 7	
Ac-RGDLGAbuLCitAib	30			3, 7	
Ac-RGDLFAbuLCitAib	26			1	
Ac-RGDLAKLCitAib	27			3, 6	
Ac-RGDLAELCitAib	28			2, 4	
Ac-RGDLAFLCitAib	29			2	
Ac-RGDLAQLCitAib	78			3, 6	
Ac-RGDLAPLCitAib	32			2, 8	
Ac-RGDLAc-LCit	6			3, 3	
Ac-RGDL Ac-LF Aib	15			3, 6	
Ac-RGDLAc-LPAib	79			1, 6	
Ac-RGDLAc-LCitK	8			5, 2	
Ac-RGDLAc-LCitE	9			4	
Ac-RGDLAc-LCitF	10			3, 7	
Ac-RGDLAc-LCitQ	11			4, 4	
Ac-RGDLAc-LCitG	12			4, 8	
Ac-RGDLAc-LCitAib	5			3, 8	
CH ₃ (CH ₂) _i CO-RGDLAc-LCitAib	80			4, 2	
CH ₃ (CH ₂) ₂ CORGLAc-LCitAib	19			4, 3	
CH ₃ (CH ₂) ₃ CO-RGDLAc-LCitAib	20			4, 1	
CH ₃ (CH ₂) ₄ CO-RGDLAc-LCitAib	21			3, 9	
CH ₃ O(CH ₂ CH ₂ O) _i CH ₂ CH ₂ CO-RGDLAc-LCitAib	81			3, 8	
CH ₃ O(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ CH ₂ CO-RGDLAc-LCitAib	82			3, 6	
CH ₃ O(CH ₂ CH ₂ O) ₃ CH ₂ CH ₂ CO-RGDLAc-LCitAib	83			3, 7	
CH ₃ O(CH ₂ CH ₂ O) ₅ CH ₂ CH ₂ CO-RGDLAc-LCitAib	84			1, 6	
Ac-RGDLATLRQL	2			4, 7	
RGDLAc-LCitAibL	3			4, 6	
Ac-RGDLAc-LCitAibL	4			4, 6	
Ac-RGDLAc-L	7			2, 6	
Ac-RGDLAc-LAib	36			3, 2	
Ac-RGDLAc-LKAib	13			5, 4	
Ac-RGDLAc-LEAib	14			1, 9	
Ac-RGDLAc-LGAib	17			4	
Ac-RGDLAc-LCitP	33			4	
Ac-RGDLAc-LQAib	16			4, 4	
Ac-RGDLAGLCitAib	31			3, 8	

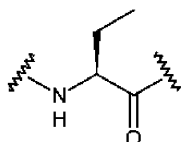
Некоторые аббревиатуры нестандартных аминокислот и других химических групп, идентифицированных в предыдущей таблице, имеют следующие химические структуры:



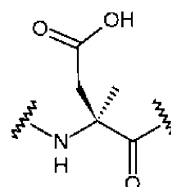
Aib представляет
 α -аминоизомасляную кислоту



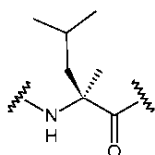
Cit представляет цитруллин



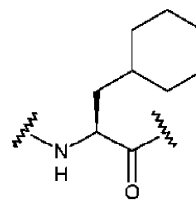
Abu представляет
L- α -аминомасляную кислоту



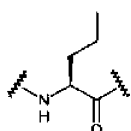
α MeD представляет
 α -метиласпартат



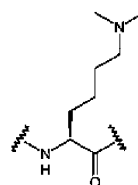
α MeL представляет
 α -метиллейцин



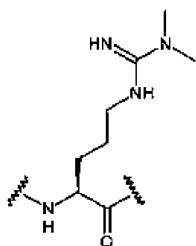
Cha представляет
 β циклогексилаланин



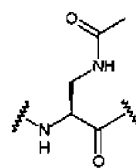
Nva представляет норвалин



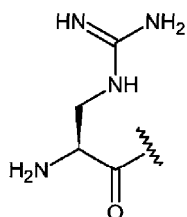
K (Me)₂ представляет
N, N- ϵ -диметиллизин



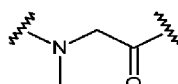
R (Me)₂ представляет
диметиларгинин



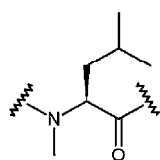
Dap (Ac)



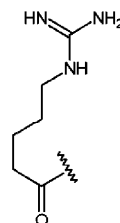
N_{Me}G представляет
N-метилглицин



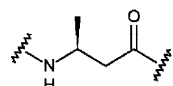
Dap (гуанидин)



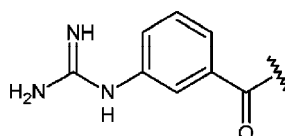
N_{Me}L представляет
N-метиллейцин



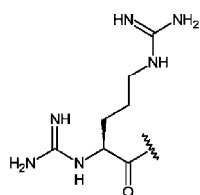
деамино-R представляет
деамино-аргинин



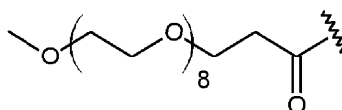
β3-hA представляет
β-гомоаланин



метагуанидинбензоик



Гуанидинил-R представляет
гуанидиниларгинин



MeO-PEG₈

Пример 4. Внутритрахеальное введение In vivo средств РНКи, целенаправленно воздействующих на альфа-ENaC, конъюгированных с лигандами интегрина αvβ6 у крыс.

Композиции двухцепочечных олигонуклеотидов, которые содержали смысловую цепь и антисмысловую цепь, каждый из которых имеет менее чем 26 нуклеотидов (т.е. разновидность средства РНКи), синтезировали согласно фосфорамидитному методу на твердой фазе в соответствии с общими методиками, известными в данной области и широко используемыми в синтезе олигонуклеотидов. Синтез средств РНКи в настоящем описании проводили на твердой подложке, сделанной из поставляемого на рынок стекла с заданным размером пор (CPG, 500 Å или 600 Å, полученного от Prime Synthesis, Aston, PA, USA), с использованием либо MerMade96E® (Bioautomation), MerMade12® (Bioautomation) или OP Pilot 100 (GE Healthcare) для синтеза в зависимости от масштаба. Все РНК и 2'-модифицированные РНК фос-

форамитиды были куплены на рынок (Thermo Fisher Scientific (Milwaukee, WI, USA)). Для расщепления и снятия защиты после завершения твердофазного синтеза, высушенную твердую подложку обрабатывали 40 мас.% раствора метиламина в воде и 28% раствора гидроксида аммония (Aldrich) с объемом 1:1 в течение 1,5 ч при 30°C. Раствор выпаривали и сухой остаток восстанавливали в воде. Для очистки неочищенные олигомеры очищали посредством анионообменной HPLC, используя 13 мкм колонку TSKgel SuperQ-5PW и систему Shimadzu LC-8. Буфером А был 20 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 9,0 и содержал 20% ацетонитрил, а буфером В был тот же самый, что и буфер А с добавлением 1,5 M натрия хлорида. Регистрировали УФ следы при 260 нм. Надлежащие фракции объединяли, затем прогоняли на эксклюзионной HPLC, используя колонку GE Healthcare XK 26/40, заполненную мелким сефадексом G-25 с рабочим буфером из 100 mM бикарбоната аммония, pH 6,7 и 20% ацетонитрила. Для отжига комплементарные цепи перемешивали путем соединения эквимольных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 1×PBS (фосфатно-буферном солевом растворе, 1×, Corning, Cellgro) с образованием средства РНКи.

Некоторые средства РНКи лиофилизировали и сохраняли при -15-25°C. Двойную концентрацию определяли посредством измерения поглощающей способности раствора на спектрометре UV-Vis в 1×PBS. Затем для определения двойной концентрации поглощающую способность раствора при 260 нм умножали на коэффициент преобразования и коэффициент разбавления. Если не утверждается иное, весь коэффициент преобразования составлял 0,037 мг/(мл·см). Для некоторых экспериментов коэффициент преобразования рассчитывали из экспериментально определенного коэффициента затухания.

Средства РНКи, синтезированные для примера 4, содержали антисмысловую цепь, имеющую последовательность нуклеиновых оснований, по меньшей мере частично комплементарную гену, экспрессирующему субединицу альфа амилорид-чувствительного эпителиального натриевого канала (широко называемого альфа-ENaC или SCNN1A). Средства РНКи к альфа-ENaC разработали с возможностью разрушения или ингибирования трансляции транскриптов информационной РНК (мРНК) альфа-ENaC специфическим для последовательности образом, ингибируя посредством этого экспрессию гена альфа-ENaC. Средства РНКи состояли из модифицированных нуклеотидов и более чем одной нефосфодиэфирной связи.

В 1 день и 2 день исследования самцу крысы Sprague-Dawley внутритрахеально посредством микрораспылительного устройства (Penn Century, Philadelphia, PA) вводили дозу 200 мкл, которая включала следующие группы получения лекарства

- (1) 5% декстрозы в водной несущей среде (D5W);
- (2) 1,5 мг/кг средства РНКи к альфа-ENaC без лиганда ("средства голой РНКи") в виде готовой формы с 5% декстрозой;
- (3) 1,5 мг/кг средства РНКи к альфа-ENaC, конъюгированного с лигандом интегрин $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ фиг. 3 (с лигандом интегрин $\alpha\text{v}\beta\text{6}$, конъюгированным на 5' терминальном конце смысловой цепи), в виде готовой формы с 5% декстрозой; или
- (4) 1,5 мг/кг средства РНКи к альфа-ENaC, конъюгированного с неактивированным лигандом интегрин $\alpha\text{v}\beta\text{6}$, имеющим структуру Ac-RGELAc-L-CitAibL (SEQ ID NO: 132), служащую в качестве лиганда отрицательного контроля. Полагают, что для связывания лиганда с рецепторами интегрин альфа- v требуется аспарагиновая кислота (D) в мотиве 'RGD', и лиганды с замещением глутаминовой кислоты (E) обладают значительно сниженной аффинностью связывания интегрин αv . В группах 2, 3 и 4 использовали то же самое средство РНКи к альфа-ENaC.

Используемый лиганд интегрин $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ синтезировали в виде сложного эфира TFP (как показано на фиг. 1), используя общие методы синтеза пептидов, хорошо известные в данной области и аналогичные методам, изложенным в примере 1 в настоящем описании, за исключением расщепления смолы, что достигалось при использовании 20% HFIP (гексофторизопропанола) в DCM (дихлорметане) в течение от 30 мин до одного часа, вместо расщепления TFA. 5' терминальный конец смысловой цепи средства РНКи модифицировали C_6 амином ($-\text{NH}_2$). Затем лиганд интегрин $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ TFP-сложного эфира конъюгировали с аминок группой, расположенной на 5' терминальном конце модифицированной смысловой цепи средства РНКи, используя 3 эквивалента лиганда интегрин $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ TFP-сложного эфира в DMSO:вода 9:1 и избыточное количество триэтиламина в качестве основы, при комнатной температуре. Очистку проводили путем добавления в раствор ACN для осаждения продукта и сушки при сильном разрежении.

Лечение получали по четыре (4) крысы в группе. Крыс умерщвляли на 5 день исследования и из обоих легких выделяли общую РНК после сбора и гомогенизации. Представленность мРНК альфа-ENaC количественно анализировали посредством количественной ПЦР на основе зонда, нормировали по экспрессии GAPDH и экспрессировали в виде фракции контрольной группы несущей среды (геометрическое среднее $\pm$ 95% доверительный интервал).

Таблица 3

Относительная экспрессия мРНК альфа-ENaC, нормированной по контролю примера 4

Группа	Относительная экспрессия (Геометрическое среднее)	Нижний/Верхний 95% Доверительный Интервал
(1) несущая среда 5% декстроза	1,000	0,77/1,30
(2) Средство голой РНКи (без лиганда)	0,54	0,24/1,22
(3) конъюгат лиганд $\alpha\upsilon\beta 6$ Фиг. 3-Средство	0,22	0,11/0,44
(4) конъюгат RGE-контрольный лиганд-	0,43	0,26/0,73

Как показано в табл. 3 выше, лиганд $\alpha\upsilon\beta 6$ фиг. 3, конъюгированный со средством РНКи к альфа-ENaC, продемонстрировал повышенный относительный нокдаун мРНК альфа-ENaC (приблизительно 78% нокдаун) по сравнению со средством голой РНКи (46% нокдаун) и средством РНКи, конъюгированным с RGE-контрольным лигандом (57% нокдаун) альфа-ENaC мишени легкого *in vivo*.

Пример 5. Внутритрахеальное введение *In vivo* средств РНКи, целенаправленно воздействующих на альфа-ENaC, конъюгированных с лигандами интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$ у крыс.

Средства РНКи к альфа-ENaC, аналогичные средствам, описанным в примере 4, синтезировали следуя таким же методикам синтеза. В 1 день и 2 день исследования самцам крыс Sprague-Dawley посредством микрораспылительного устройства (Penn Century, Philadelphia, PA) вводили дозу 200 мкл, которая включала следующие группы получения лекарства:

- (1) несущую среду D5W;
- (2) 1,5 мг/кг средства РНКи без лиганда ("средства голой РНКи") в виде готовой формы в D5W;
- (3) 1,5 мг/кг средства РНКи к альфа-ENaC, конъюгированного с лигандом интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$ фиг. 3, в виде готовой формы в D5W; или
- (4) 1,5 мг/кг средства РНКи к альфа-ENaC, конъюгированного с тридентатным лигандом интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$, имеющим структуру, показанную на фиг. 11.

Средства РНКи разработали для ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC. То же самое средство РНКи к альфа-ENaC использовали в группах 2, 3 и 4. 5' терминальный конец смысловой цепи средств РНКи модифицировали C_6 амином ($-NH_2$), как в примере 4. Лиганды интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$ фиг. 3 синтезировали и конъюгировали со средствами РНКи к альфа-ENaC, следуя тем же методикам примера 4. При конъюгации с лигандом $\alpha\upsilon\beta 6$, показанным на фиг. 11, средство РНКи к альфа-ENaC сперва функционализировали DBCO-PEG₅-сложный эфир NHS путем конъюгации с 5' амин функционализированным терминальным концом смысловой цепи, используя в качестве основы триэтиламин. Синтезировали тридентатный лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$, имеющий реакционноспособную группу PEG-азид, как показано на фиг. 10. После осаждения в системе растворителей фосфатный буферный солевой раствор/ацетонитрил тридентатный лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$ конъюгировали со средством РНКи, используя циклоприсоединение без меди.

Лечение получали по пять (5) крыс в группе. Крыс умерщвляли на 5 день исследования и после сбора и гомогенизации из обоих легких выделяли общую РНК. Представленность мРНК мишени количественно анализировали посредством количественной ПЦР на основе зонда, нормировали по экспрессии GAPDH и экспрессировали в виде фракции контрольной группы несущей среды (геометрическое среднее $\pm$ 95% доверительный интервал).

Таблица 4

Относительная экспрессия мРНК альфа-ENaC, нормированной по контролю примера 5

Группа	Относительная экспрессия (Геометрическое среднее)	Нижний/Верхний 95% Доверительный Интервал
(1) несущая среда 5% декстроза	1,000	0,72/1,40
(2) Средство голой РНКи (без лиганда)	0,34	0,25/0,45
(3) конъюгат лиганд $\alpha\upsilon\beta 6$ Фиг. 3-средство	0,29	0,15/0,55
(4) конъюгат [лиганд $\alpha\upsilon\beta 6$ Фиг. 11 ((т.е. Лиганд $\alpha\upsilon\beta 6$) ₃)]-средство РНКи	0,21	0,09/0,51

Как показано в табл. 4 выше, конъюгация трех лигандов $\alpha\upsilon\beta 6$ (образующих "тридентатный" лиганд), как показано на фиг. 11, со средством РНКи к альфа-ENaC, продемонстрировала повышенный относительный нокдаун (приблизительно 79%) по сравнению со средством РНКи, конъюгированным с од-

ним лигандом $\alpha\nu\beta 6$ (фиг. 3) (71%), и средством голой РНКи (66%) *in vivo*.

Пример 6. Внутритрахеальное введение средств РНКи *In vivo*, целенаправленно воздействующих на альфа-ENaC, конъюгированных с лигандами интегрин $\alpha\nu\beta 6$ у крыс.

Средства РНКи к альфа-ENaC, аналогичные средства описанным в примере 4, синтезировали следуя тем же методикам синтеза. В 1 день и 2 день исследования самцам крыс Sprague-Dawley вводили дозу 200 мкл посредством микрораспылительного устройства (Penn Century, Philadelphia, PA), которая включала следующие группы получения лекарства:

- (1) несущую среду D5W;
- (2) 3 мг/кг средства РНКи без лиганда ("средства голой РНКи") в виде готовой формы в D5W; или
- (3) 3,0 мг/кг средства РНКи к альфа-ENaC, конъюгированного с лигандом интегрин $\alpha\nu\beta 6$ фиг. 3 в виде готовой формы в D5W.

Средство РНКи к альфа-ENaC и лиганды интегрин $\alpha\nu\beta 6$ синтезировали и конъюгировали согласно тем же методикам, что изложены в примере 4.

Лечение получали по пять (5) крыс в группе. Крыс умерщвляли на 5 день исследования и после сбора и гомогенизации из обоих легких выделяли общую РНК. Представленность мРНК мишени количественно анализировали посредством количественной ПЦР на основе зонда, нормировали по экспрессии GAPDH и экспрессировали в виде фракции контрольной группы несущей среды (геометрическое среднее $\pm$ 95% доверительный интервал).

Таблица 5

Относительная экспрессия мРНК альфа-ENaC, нормированной по контролю примера 6

Группа	Относительная экспрессия (Геометрическое среднее)	Нижний/Верхний 95% Доверительный Интервал
(1) несущая среда 5% декстроза	1,000	0,76/1,31
(2) Средство голой РНКи (без лиганда)	0,49	0,42/0,56
(3) конъюгат лиганд $\alpha\nu\beta 6$ Фиг. 3-Средство РНКи	0,17	0,12/23

Как показано в табл. 5 выше, лиганд $\alpha\nu\beta 6$ фиг. 3, конъюгированный со средством РНКи, демонстрировал повышенный относительный нокдаун (приблизительно 83% нокдаун), по сравнению со средством голой РНКи (приблизительно 51% нокдаун) мишени легкого *in vivo*.

Пример 7. Ротоглоточная аспирация *In vivo* средств РНКи, целенаправленно воздействующих на экспрессируемый в легком ген, конъюгированных с лигандами интегрин $\alpha\nu\beta 6$ у крыс.

Средства РНКи к альфа-ENaC, аналогичные средства описанным в примере 4, синтезировали следуя тем же методикам синтеза. В 1 день исследования самцам крыс Sprague-Dawley посредством ротоглоточной аспирации вводили дозу 200 мкл, которая включала следующие группы получения лекарства:

- (1) изотонический солевой раствор;
- (2) 0,5 мг/кг целенаправленно воздействующего на альфа-ENaC средства РНКи, конъюгированного с лигандом интегрин $\alpha\nu\beta 6$ фиг. 3, в виде готовой формы в изотоническом солевом растворе; или
- (3) 0,5 мг/кг целенаправленно воздействующего на альфа-ENaC средства РНКи, конъюгированного с лигандом интегрин $\alpha\nu\beta 6$ фиг. 5, в виде готовой формы в изотоническом солевом растворе.

Те же самые средства РНКи к альфа-ENaC использовали для групп 2 и 3. 5' терминальный конец смысловой цепи средства РНКи модифицировали C₆-амином (-NH₂), как изложено в примере 4. Средство РНКи к альфа-ENaC и лиганды интегрин $\alpha\nu\beta 6$ фиг. 3 синтезировали и конъюгировали согласно тем же методикам, что изложены в примере 4. Лиганды интегрин $\alpha\nu\beta 6$ фиг. 5 синтезировали в виде TFP-сложного эфира, а кроме того N-конец лиганда интегрин $\alpha\nu\beta 6$ защитили группой *fmoc*. Затем конъюгацию со средством РНКи выполняли таким же образом, как изложено в примере 4, с последующим снятием защиты *fmoc*, используя в качестве основы триэтиламин.

Лечение получали по пять (5) крыс в группе. Крыс умерщвляли на день 9 исследования и после сбора и гомогенизации из обоих легких выделяли общую РНК. Представленность мРНК мишени количественно анализировали посредством количественной ПЦР на основе зонда, нормировали по экспрессии GAPDH и экспрессировали в виде фракции контрольной группы несущей среды (геометрическое среднее $\pm$ 95% доверительный интервал).

Таблица 6

Относительная экспрессия мРНК альфа-ENaC, нормированной по контролю примера 7

Группа	Относительная экспрессия (Геометрическое среднее)	Нижний/Верхний 95% Доверительный Интервал
(1) изотонический Солевой раствор	1,000	0,85/1,17
(2) конъюгат лиганд $\alpha\upsilon\beta 6$ Фиг. 3-Средство РНКи	0,632	0,49/0,80
(3) конъюгат лиганд $\alpha\upsilon\beta 6$ Фиг. 5-Средство РНКи	0,592	0,50/0,70

Как показано в табл. 6 выше, оба лиганда $\alpha\upsilon\beta 6$ фиг. 3 и фиг. 5, конъюгированных со средством РНКи, демонстрировали нокдаун альфа-ENaC мишени легкого *in vivo*.

Пример 8. Внутритрахеальное введение целенаправленно воздействующих на альфа-ENaC средств РНКи *in vivo*, конъюгированных с лигандами интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$ и поли-L-лизиновым каркасом у крыс.

Средства РНКи к альфа-ENaC, аналогичные описанным в примере 4 средствам, синтезировали следуя тем же методикам синтеза. В 1 день и 2 день исследования самцам крыс Sprague-Dawley посредством микрораспылительного устройства (Penn Century, Philadelphia, PA) вводили дозу 200 мкл либо

- (1) D5W (5% декстроза в воде); либо
- (2) 0,5 мг/кг средства РНКи без лиганда ("средства голой РНКи") в виде готовой формы в D5W; либо
- (3) 1,5 мг/кг средства голой РНКи в виде готовой формы в D5W; либо
- (4) 5 мг/кг средства голой РНКи в виде готовой формы в D5W; либо
- (5) 0,5 мг/кг средства РНКи к альфа-ENaC, конъюгированного с лигандом интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$ фиг. 4 посредством поли-L-лизинового (PLL) каркаса, в виде готовой формы в D5W; либо
- (6) 1,5 мг/кг средства РНКи к альфа-ENaC, конъюгированного с лигандом интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$ фиг. 4 посредством PLL каркаса, в виде готовой формы в D5W; либо
- (7) 5 мг/кг средства РНКи к альфа-ENaC, конъюгированного с лигандом интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$ фиг. 4 посредством PLL каркаса в виде готовой формы в D5W.

Средства РНКи разработали для ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC. То же средство РНКи к альфа-ENaC использовали в группах 2-7. Лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$ первоначально синтезировали в виде TFP-сложного эфира (показано на фиг. 2). PLL каркас, используемый в группах 5, 6 и 7 примера 8, приблизительно на одну сотую (100) состоял из L-лизиновых мономерных единиц (приблизительно 12 килодальтон). Поли-L-лизиновый полимер модифицировали 3 эквивалентами SMPT (4-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил- α (2-пиридилдитио)толуола), а 5' амин (модифицированный C₆-амин) смысловой цепи средства РНКи модифицировали SATA (N-сукцинимидил S-ацетилтиоацетатом). Далее лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$ фиг. 2 (15 эквивалентов) добавляли в виде твердого вещества и встряхивали в течение 1 ч. Затем добавляли расщепляемый протеазой функционализированный аланин-цитруллин-PEG₁₂ (10 эквивалентов; функционализированных пара-нитрофенилкарбонатом). Спустя 15 мин по каплям добавляли модифицированное SATA средство РНКи (один эквивалент), поддерживая pH 8,6. Оставшиеся лизиновые группы функционализировали расщепляемым протеазой функционализированным аланин-цитруллин-PEG₁₂. Продукт очищали фильтрованием тангенциальным потоком.

Лечение получали по пять (5) крыс в группе. Крыс умерщвляли на 5 день исследования и после сбора и гомогенизации из обоих легких выделяли общую РНК. Представленность мРНК мишени количественно анализировали посредством количественной ПЦР на основе зонда, нормировали по экспрессии GAPDH и экспрессировали в виде фракции контрольной группы несущей среды (геометрическое среднее +/- 95% доверительный интервал). Данные отражены в графике фиг. 12.

Как показано на фиг. 12, лиганд $\alpha\upsilon\beta 6$ фиг. 4, конъюгированный с поли-L-лизиновым каркасом и средством РНКи, демонстрировал повышенный относительный нокдаун на всех трех уровнях дозы по сравнению со средством голой РНКи (нокдаун 68% против нокдауна 47% при дозе 0,5 мг/кг, нокдаун 78% против нокдауна 47% при дозе 1,5 мг/кг и нокдаун 86% против нокдауна 75% при дозе 5 мг/кг).

Пример 9. Избирательное поглощение меченых конъюгатов лигандов $\alpha\upsilon\beta 6$ первичными эпителиальными клетками *in vitro*.

Первичные эпителиальные, эндотелиальные и гладкомышечные клетки легкого человека культивировали и в течение 24 ч подвергали воздействию

- (1) меченого Су3 (красным) полиакрилатного полимерного каркаса без лиганда (без конъюгата лиганда); или
- (2) меченого Су3 (красным) полиакрилатного полимерного каркаса, конъюгированного с лигандом интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$ фиг. 7 (конъюгат лиганда $\alpha\upsilon\beta 6$).

Клетки окрашивали FITC-фаллоидином (F-актином, зеленым) и красителем Хехест (ДНК, синим) и визуализировали посредством флуоресцентной микроскопии.

Изображения флуоресцентной микроскопии получали, используя стандартные способы, известные в данной области. Флуоресцентные изображения демонстрировали, что меченые СуЗ конъюгаты без лиганда интегрин $\alpha\nu\beta 6$ не были интернализированы каким-либо типом клеток. Однако СуЗ конъюгаты с лигандом $\alpha\nu\beta 6$ фиг. 7 были интернализированы первичными эпителиальными клетками легкого (как показано накоплением красного сигнала внутри эндосомальных отделов первичных эпителиальных клеток легкого на изображении), но не были интернализированы первичными эндотелиальными и гладкомышечными клетками. Это показывает, что раскрытые в настоящем описании лиганды интегрин $\alpha\nu\beta 6$ допускают избирательную интернализацию эпителиальными клетками, экспрессирующими интегрин $\alpha\nu\beta 6$.

Пример 10. Избирательное поглощение меченых конъюгатов лигандов $\alpha\nu\beta 6$ эпителиальными тканями *in vivo*.

Мышам C57bl/6 инъецировали внутривенную дозу 120 мкг

(1) меченого СуЗ (красного) полиакрилатного полимерного каркаса без лиганда (без конъюгата лиганда); или

(2) меченого СуЗ (красного) полиакрилатного полимерного каркаса, конъюгированного с лигандом интегрин $\alpha\nu\beta 6$ фиг. 7 (конъюгат лиганда $\alpha\nu\beta 6$); или

(3) меченого СуЗ (красного) полиакрилатного полимерного каркаса, конъюгированного с неактивированным лигандом интегрин $\alpha\nu\beta 6$, имеющим структуру Ac-RGE₂LAc-L-CitAibL (SEQ ID NO: 132), который, как ранее описано в примере 4, используют в качестве лиганда отрицательного контроля.

Через 24 ч после инъекции мышей умерщвляли, а ткани собирали, фиксировали, обрабатывали и иссекали. Срезы тканей окрашивали FITC-фаллоидином (F-актином, зеленым) и красителем Хехест (ДНК, синим) и визуализировали посредством флуоресцентной микроскопии.

А. Бронхиолярные эпителиальные клетки легкого.

Изображения флуоресцентной микроскопии бронхиолярных эпителиальных клеток легкого у мышей примера 10 получали, используя стандартные способы. Из этих изображений меченый СуЗ конъюгаты (на изображениях показаны красными метками) с лигандом $\alpha\nu\beta 6$ фиг. 7 избирательно были интернализованы в эндосомальные отделы бронхиолярными эпителиальными клетками легкого *in vivo*, при том, что по существу не наблюдалась эпителиальная интернализация конструктами, которые не содержали лиганд или конъюгатами контрольного RGE-лиганда (т.е. на этих изображениях красного не было видно).

В. Почечные эпителиальные ткани.

Используя стандартные способы получали изображения флуоресцентной микроскопии почечных трубчатых эпителиальных тканей у мышей примера 10. Из этих изображений меченые СуЗ конъюгаты с лигандом $\alpha\nu\beta 6$ фиг. 7 избирательно были интернализованы в эндосомальные отделы почечными трубчатыми эпителиальными клетками *in vivo* (на изображениях показаны красными метками), при том что по существу не наблюдалась эпителиальная интернализация контрольными конъюгатами без лиганда.

С. Эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта.

Используя стандартные способы получали изображения флуоресцентной микроскопии почечных эпителиальных тканей мышей примера 10. Меченые СуЗ конъюгаты с лигандом $\alpha\nu\beta 6$ фиг. 7 избирательно были интернализованы в эндосомальные отделы эпителиальными клетками GI тракта *in vivo* как в тонком кишечнике, так и в желчном пузыре (на изображениях показаны красными метками), при том что по существу не наблюдалась эпителиальная интернализация контрольными конъюгатами без лиганда.

Другие варианты осуществления

Должно быть понятно, что, хотя изобретение было описано в сочетании с его подробным описанием, вышеизложенное описание предназначено для объяснения, а не для ограничения объема изобретения, который определяется объемом приложенной формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в пределах объема следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$, содержащий

$RG^1DLXaa^1Xaa^2L-Xaa^3Xaa^4L-R^1$ (SEQ ID NO: 96) (Формула VIII),

в которой R представляет L-аргинин;

G^1 представляет L-глицин или N-метилглицин;

D представляет L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат);

L представляет L-лейцин;

Xaa^1 представляет L-аланин;

Xaa^2 представляет L- α -аминомасляную кислоту (Abu);

Xaa^3 представляет цитруллин;

Хаа⁴ представляет α-аминоизомасляную кислоту (Aib);

R¹ содержит PEG и/или связывающую группу.

2. Лиганд интегрин αvβ6 по п.1, в котором R¹ содержит полиэтиленгликоль, имеющий 2-20 единиц этиленоксида.

3. Лиганд интегрин αvβ6 по любому из пп.1, 2, где указанный лиганд интегрин αvβ6 содержит аминотерминальный кэп.

4. Лиганд интегрин αvβ6 по п.3, где аминотерминальный кэп выбран из группы, состоящей из CH₃CO, CH₃CH₂CO, CH₃(CH₂)₂CO, (CH₃)₂CHCO, CH₃(CH₂)₃CO, (CH₃)₂CHCH₂CO, CH₃CH₂CH(CH₃)CO, (CH₃)₃CCO, CH₃(CH₂)₄CO, CH₃SO₂, CH₃CH₂SO₂, CH₃(CH₂)₂SO₂, (CH₃)₂CHSO₂, CH₃(CH₂)₃SO₂, (CH₃)₂CHCH₂SO₂, CH₃CH₂CH(CH₃)SO₂, (CH₃)₃CSO₂, PhCO, PhSO₂, алкильной группы, имеющей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 атомов углерода, метила, этила, пропила, бутила, пентила, NH₂NH, PEG, гуанидинила, CH₃OCH₂CH₂OCH₂CH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₅CH₂CH₂CO, CH₃OCH₂CH₂OCH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₂CH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₃CH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₄CH₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₅CH₂CO, CH₃OCH₂CH₂OCO, CH₃O(CH₂CH₂O)₂CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₃CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₄CO, CH₃O(CH₂CH₂O)₅CO, HOCH₂CH₂OCH₂CH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₅CH₂CH₂CO, HOCH₂CH₂OCH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₂CH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₃CH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₄CH₂CO, HO(CH₂CH₂O)₅CH₂CO, HOCH₂CH₂OCO, HO(CH₂CH₂O)₂CO, HO(CH₂CH₂O)₃CO, HO(CH₂CH₂O)₄CO, HO(CH₂CH₂O)₅CO, CH₃CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₄CH₂CH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₅CH₂CH₂CO, CH₃CH₂OCH₂CH₂OCH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₂CH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₃CH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₄CH₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₅CH₂CO, CH₃CH₂OCH₂CH₂OCO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₂CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₃CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₄CO, CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₅CO, CH₃OCH₂CH₂CO, HOCH₂CH₂CO или CH₃CH₂OCH₂CH₂CO.

5. Лиганд интегрин αvβ6 по п.4, где аминотерминальный кэп представляет собой CH₃CO.

6. Лиганд интегрин αvβ6 по п.1, где указанный лиганд интегрин αvβ6 содержит последовательность sequence SEQ ID NO: 4 (Ac-RGDLAAbuLCitAibL).

7. Лиганд интегрин αvβ6 по любому из пп.1-6, где указанный лиганд интегрин αvβ6 дополнительно конъюгирован с карго-молекулой.

8. Лиганд интегрин αvβ6 по любому из пп.1-7, где указанный лиганд интегрин αvβ6 конъюгирован с карго-молекулой, которая содержит малую молекулу, антитело, фрагмент антитела, иммуноглобулин, моноклональное антитело, метку или маркер, липид, натуральную или модифицированную нуклеиновую кислоту или полинуклеотид, пептид, аптамер, полимер, полиамин, белок, токсин, витамин, полиэтиленгликоль, гаптен, диоксигенин, биотин, радиоактивный атом или молекулу либо флуорофор.

9. Лиганд интегрин αvβ6 по любому из пп.1-8, где указанный лиганд интегрин αvβ6 конъюгирован с карго-молекулой, которая содержит олигомерное соединение.

10. Лиганд интегрин αvβ6 по п.9, где указанное олигомерное соединение представляет собой средство РНКи.

11. Фармацевтическая композиция для доставки карго-молекулы, содержащая лиганд интегрин αvβ6 по любому из пп.7-10 и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

12. Способ доставки одной или более карго-молекул в клетку *in vivo*, где указанный способ включает введение субъекту лиганда, имеющего аффинность к интегрину αvβ6, конъюгированного с одной или более карго-молекулой, где указанный лиганд интегрин αvβ6 представляет собой лиганд интегрин αvβ6 по любому из пп.1-10.

13. Способ по п.12, в котором клетку выбирают из группы, состоящей из альвеолярной эпителиальной клетки I и II типа, бокаловидной клетки, секреторной эпителиальной клетки, ресничной эпителиальной клетки, эпителиальной клетки роговицы и конъюнктивы, эпителиальной клетки кожи, холангиоцита, энтероцита, эпителиальной клетки протоков, железистой эпителиальной клетки, почечного канальца и эпителиальных опухолей (карцином).

14. Способ по п.12 или 13, в котором одна или более карго-молекул содержат олигомерное соединение.

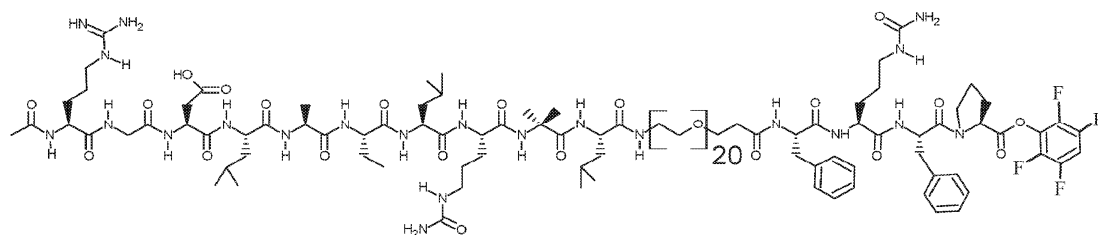
15. Способ по п.14, в котором указанное олигомерное соединение представляет собой средство РНКи.

16. Способ ингибирования экспрессии целевого гена в клетке *in vivo*, где указанный способ включает введение субъекту олигомерного соединения, конъюгированного с лигандом интегрин αvβ6 по любому из пп.1-10.

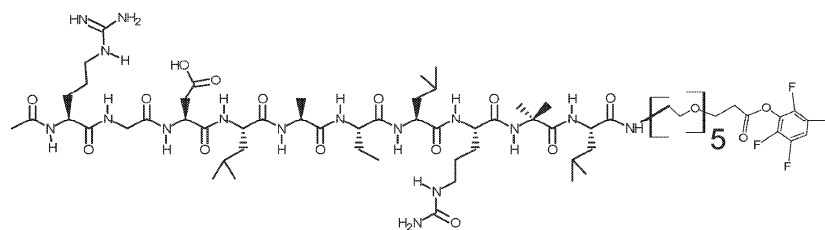
17. Способ по п.16, в котором клетку выбирают из группы, состоящей из альвеолярной эпителиальной клетки I и II типа, бокаловидной клетки, секреторной эпителиальной клетки, ресничной эпителиальной клетки, эпителиальной клетки роговицы и конъюнктивы, эпителиальной клетки кожи, холангиоцита, энтероцита, эпителиальной клетки протоков, железистой эпителиальной клетки, почечного канальца и

эпителиальных опухолей (карцином).

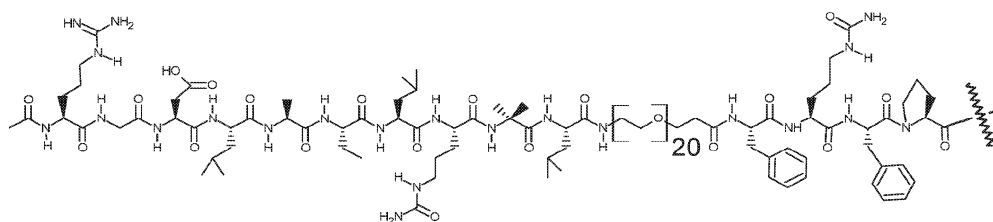
18. Способ по п.16 или 17, в котором указанное олигомерное соединение представляет собой средство РНКи.



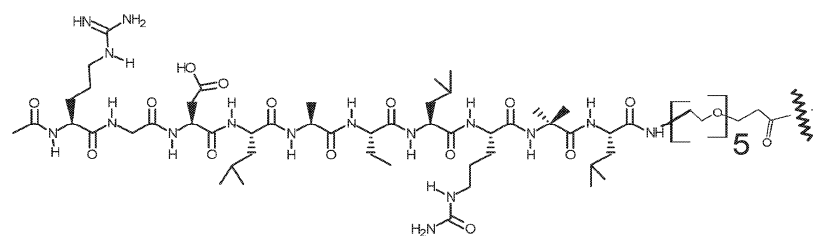
Фиг. 1



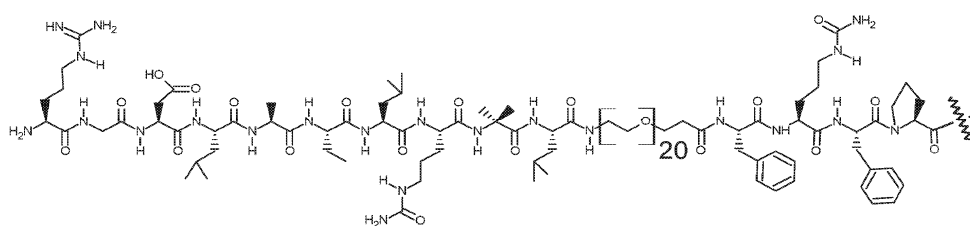
Фиг. 2



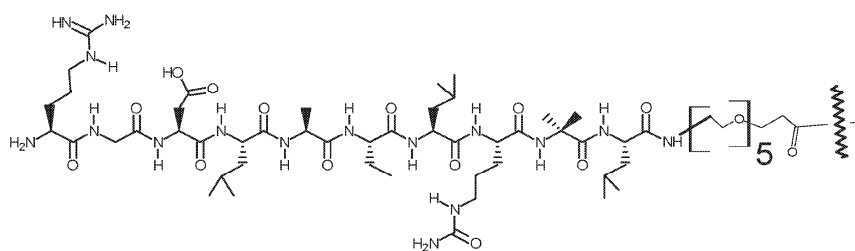
Фиг. 3



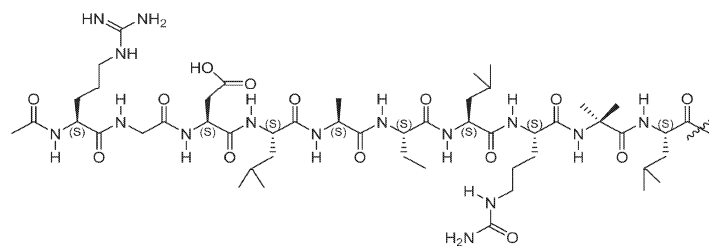
Фиг. 4



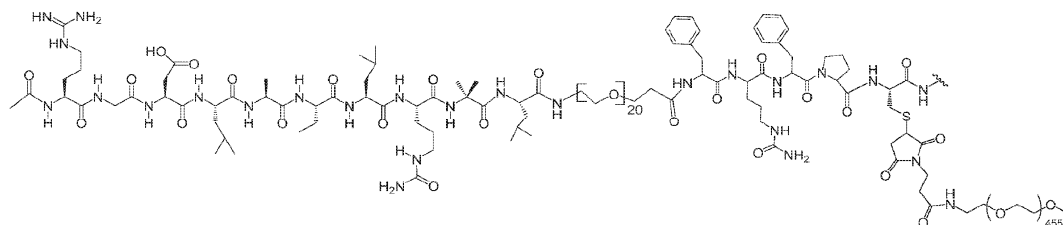
Фиг. 5



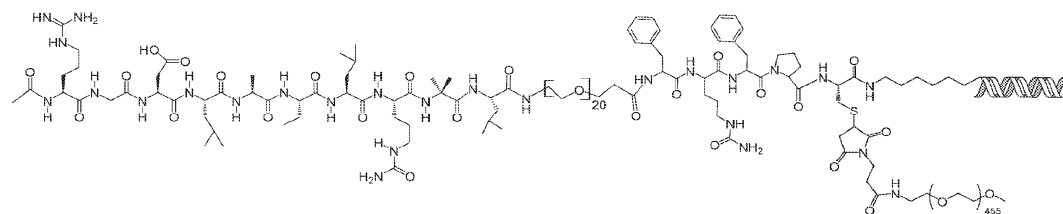
Фиг. 6



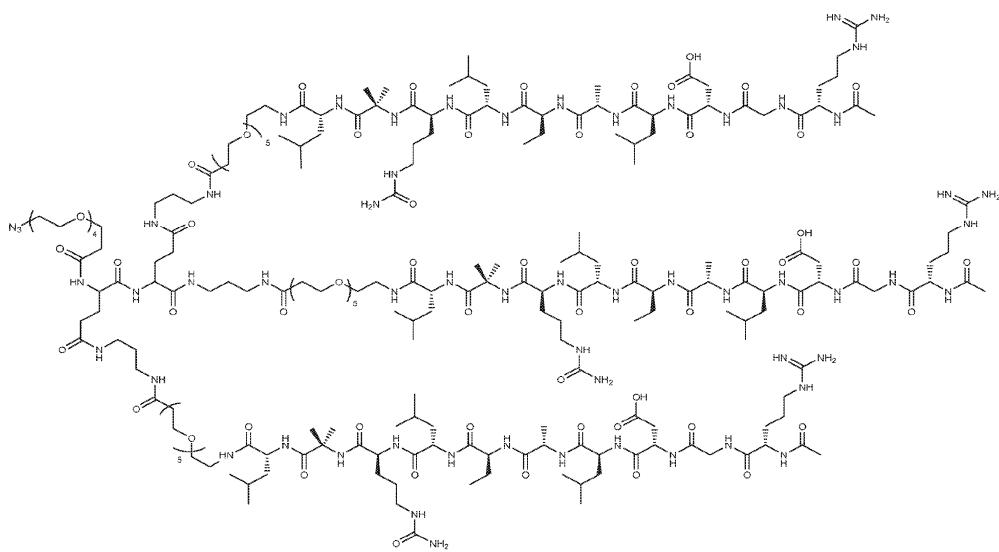
Фиг. 7



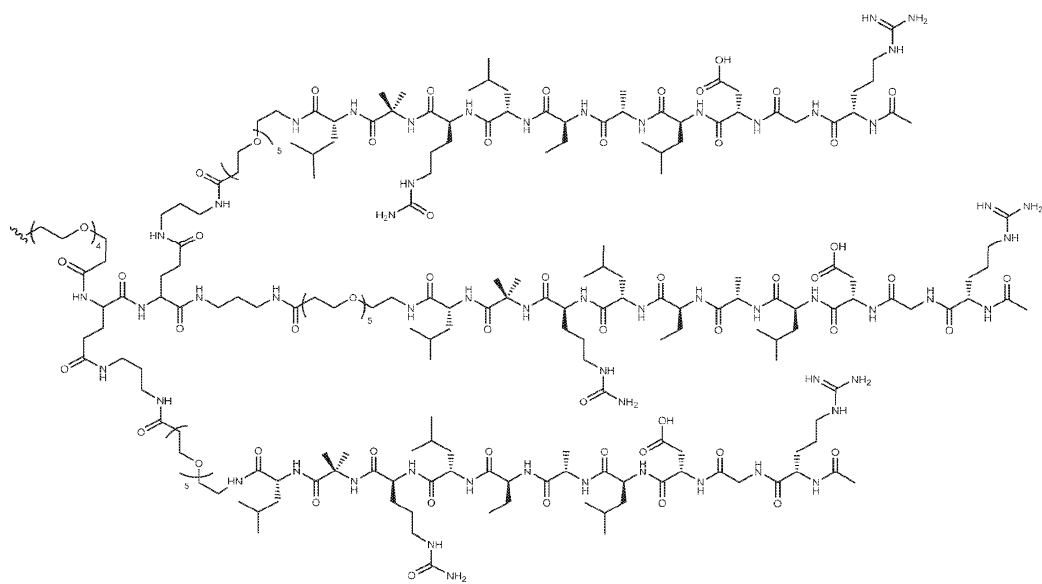
Фиг. 8



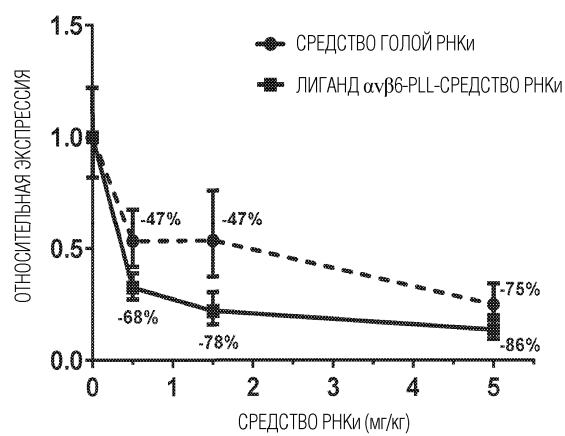
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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